

Université de Sherbrooke

**Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans le contrôle de la tumorigenèse et de
l'inflammation intestinale**

Par
Katia Beaudry
Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2017

Membres du jury d'évaluation
Nathalie Rivard, programme de Biologie Cellulaire
Marie-Josée Boucher, programme de Biologie Cellulaire
Pedro Miguel Geraldès, programme de Physiologie

© Katia Beaudry, 2017

Résumé

La voie de signalisation ERK/MAPK est connue pour son implication dans la progression du cycle cellulaire et dans le contrôle de la différenciation dans les cellules épithéliales intestinales. La phosphatase cytoplasmique DUSP6 a pour seuls substrats les kinases ERK1/2, kinases effectrices de la voie ERK/MAPK. Son rôle dans le contrôle des différents processus influencés par la signalisation ERK/MAPK n'a encore jamais été étudié dans l'épithélium intestinal et colique, malgré l'implication connue de cette voie de signalisation dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pour étudier son rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale, un modèle de souris invalidée pour *Dusp6* a été utilisé. De façon intéressante, une augmentation de la prolifération cryptale et un allongement des cryptes ont été observés dans le côlon de souris *Dusp6*^{-/-} comparé aux souris *Dusp6*^{+/+}. Cette augmentation de la prolifération cryptale permet notamment un développement plus rapide d'organoïdes de côlon démontrant ainsi une meilleure capacité de régénération épithéliale. De plus, une augmentation du nombre de cellules caliciformes a été observée dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6*. Une augmentation du nombre de cellules de Paneth et des cellules intermédiaires Paneth/caliciformes a été aussi observée dans l'iléon des souris *Dusp6*^{-/-}. Cette augmentation de la prolifération, de la différenciation des cellules à mucus et de la capacité de régénération protège l'épithélium colique d'un stress induit par un traitement au dextran sulfate (DSS). Pour étudier l'implication de la phosphatase DUSP6 dans la tumorigenèse colorectale, un modèle de souris *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{-/-} a été généré. De façon intéressante, ces souris ont développé plus de polypes dans l'intestin grêle et dans le côlon que les souris *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{+/+}. De plus, l'expression de *DUSP6* en ARNm a été analysée dans des tumeurs colorectales humaines et pairées avec une marge saine. De manière intéressante, le niveau des transcrits de DUSP6 est diminué dans les tumeurs colorectales et ce, de façon plus prononcée dans les stades avancés. Finalement, le rôle de DUSP6 dans différents processus associés à la carcinogenèse a été étudié dans des cellules cancéreuses colorectales sous-exprimant *DUSP6* grâce à un ARN interférant. Une augmentation de l'activité ERK1/2, de la capacité de croissance en indépendance d'ancrage et de la capacité invasive a été observée chez les cellules HT29 sous-exprimant DUSP6, mais pas chez les HCT116. En conclusion, DUSP6 est impliqué dans le maintien de l'homéostasie grâce à son contrôle de la prolifération cryptale et de la différenciation cellulaire. De plus, en inhibant l'activité ERK1/2, cette phosphatase régularise négativement la tumorigenèse intestinale.

Mots-clés : DUSP6, ERK/MAPK, cancer colorectal, inflammation intestinale, homéostasie intestinale

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	1
1. Le système digestif.....	1
1.1 Structure et fonction.....	1
1.2 L'intestin grêle.....	2
1.2.1 L'épithélium intestinal.....	3
1.3 Le côlon.....	4
2. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire.....	6
2.1 La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	6
2.2 La voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)/MAPK (Mitogen-activated protein kinases).....	9
2.3 La voie de signalisation Notch.....	11
2.4 La détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	12
3. Les maladies inflammatoires intestinales.....	16
3.1 Le microbiote intestinal.....	16
3.2 La barrière épithéliale intestinale.....	18
3.2.1 La signalisation PRR (Pattern recognition receptors).....	18
3.2.2 Barrière physique.....	19
3.2.3 Barrière biochimique.....	19
3.2.4 Barrière immunitaire.....	20
3.2 La voie ERK/MAPK dans les maladies inflammatoires intestinales.....	20
4. Le cancer colorectal.....	22
4.1 Le cancer sporadique.....	22
4.2 La voie ERK/MAPK dans le cancer colorectal.....	25
5. Les DUSPs (Dual-Specificity Phosphatases).....	27
5.1 La régulation de DUSP6.....	28
5.2 Les processus cellulaires régulés par DUSP6.....	28
5.3 DUSP6 dans le cancer.....	29
Hypothèse et objectifs.....	31

Matériel et méthodes.....	32
1. Matériel.....	32
1.1 Anticorps.....	32
2. Méthodes.....	32
2.1 Souris	32
2.2 Traitement DSS, score histologique et index de maladie.....	33
2.3 Génotypage des souris.....	33
2.4 Banque de tumeurs colorectales humaines.....	34
2.5 Extraction protéique des échantillons de souris	35
2.6 Extraction d'ARN d'échantillons de souris	35
2.7 Essais RT-PCR et PCR quantitatif.....	35
2.8 Immunobuvardage	36
2.9 Circulation et inclusion des tissus.....	37
2.10 Coloration à l'Alcian Bleu	37
2.11 Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E)	38
2.12 Immunohistochimie	38
2.13 Immunofluorescence.....	38
2.14 Préparation pour la microscopie électronique.....	39
2.15 Mise en culture d'organoïdes	39
2.15.1 Organoides de jéjunum	39
2.15.2 Organoides de côlon.....	40
2.16 Culture d'organoïdes et passages	40
2.16.1 Passage d'organoïdes de jéjunum	40
2.17 Immunofluorescence d'organoïdes et incorporation EdU	41
2.17.1 Incorporation EdU.....	41
2.17.2 Immunofluorescence d'organoïdes	41
2.18 Culture cellulaire.....	41
2.19 Production de rétrovirus et infection des cellules	42
2.19.1 Production de rétrovirus.....	42
2.19.2 Infection des cellules.....	42
2.20 Lyse cellulaire.....	43
2.21 Essais de migration/invasion à travers le Matrigel.....	43
2.22 Essais de croissance en agarose mou	43
2.23 Essais de migration par test de blessure	44
2.24 Analyses statistiques	44

Résultats.....	45
1. Les rôles de la phosphatase DUSP6 dans le maintien de l'homéostasie de l'intestin grêle et du côlon.....	45
1.1 La phosphorylation des ERK1/2 est augmentée chez les souris invalidées pour Dusp6	45
1.2 Les souris invalidées pour Dusp6 présentent un allongement des cryptes et une augmentation de la prolifération cryptale dans le côlon.	48
1.3 Expression de marqueurs de cellules souches dans le côlon.....	48
1.4 La délétion de Dusp6 dans le côlon favorise le développement d'organoïdes, ainsi que leur prolifération.....	48
1.8 La délétion de Dusp6 n'entraîne pas d'altération des cellules absorbantes ni des cellules entéroendocrines	49
1.9 La différenciation des cellules caliciformes dans l'intestin grêle et le côlon.....	55
1.10 La différenciation des cellules de Paneth.....	61
1.11 L'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le phénotype intestinal des souris invalidées pour Dusp6.....	66
2. Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans la résistance à un stress inflammatoire.....	68
2.1 Expression de DUSP6 dans la muqueuse de patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales.....	68
2.2 Les souris invalidées pour Dusp6 démontrent une résistance à l'induction d'une colite chimique.....	68
2.3 La baisse d'expression de DUSP6 favorise la restitution cellulaire.....	69
3. L'implication de la phosphatase DUSP6 dans la tumorigenèse intestinale	75
3.1 L'expression de DUSP6 dans des tumeurs colorectales humaines	75
3.2 La délétion de Dusp6 dans un modèle tumorigenèse Apc ^{Min/+} favorise la formation d'adénomes	75
3.3 La baisse d'expression de DUSP6 chez les cellules HT29 mène à une augmentation de leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage et de leur capacité invasive.....	76
3.4 La baisse d'expression de DUSP6 chez les cellules HCT116 n'affecte pas leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage et leur capacité invasive	77
4. Discussion.....	84
4.1 Contrôle de la prolifération épithéliale dans le côlon par Dusp6.....	84
4.2 Contrôle de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par la phosphatase DUSP6	86
4.3 Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans l'inflammation intestinale	90
4.4 Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans le cancer colorectal.....	91
Conclusion et perspectives.....	94
Remerciements	96

Liste des références	97
-----------------------------------	-----------

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des amorces de géotypage	33
Tableau 2 Aperçu des programmes PCR utilisés	34
Tableau 3 Liste des amorces utilisées pour les analyses par PCR quantitatif	36

Liste des figures

Figure 1 La structure de l'axe crypte-villosité intestinal et la crypte colique.....	5
Figure 2 Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire	7
Figure 3 Détermination et différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	15
Figure 4 Barrière épithéliale intestinale.....	17
Figure 5 Séquences de mutations des diverses voies de pathogénèse du cancer colorectal.....	24
Figure 6 Augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 dans l'épithélium colique des souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	46
Figure 7 Augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 dans l'épithélium iléal des souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	47
Figure 8 Les souris invalidées pour <i>Dusp6</i> présentent un allongement des cryptes dans le côlon	50
Figure 9 Les souris invalidées pour <i>Dusp6</i> présentent une hyperprolifération cryptale dans le côlon	51
Figure 10 La délétion de <i>Dusp6</i> n'altère pas l'expression de marqueurs de cellules souches dans le côlon	52
Figure 11 La délétion de <i>Dusp6</i> stimule la régénération épithéliale colique.....	53
Figure 12 La délétion de <i>Dusp6</i> favorise la prolifération cellulaire dans les organoïdes de côlon après 5 jours post-ensemencement	54
Figure 13 La délétion de <i>Dusp6</i> n'affecte pas la différenciation des cellules absorbantes.....	56
Figure 14 La délétion de <i>Dusp6</i> n'affecte pas la différenciation des cellules entéroendocrines	57
Figure 15 Augmentation du nombre de cellules caliciformes dans le côlon des souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	58
Figure 16 Augmentation de l'épaisseur de la couche interne de mucus chez les souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	59
Figure 17 La morphologie des cellules caliciformes n'est pas altérée chez les souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	60
Figure 18 La délétion de <i>Dusp6</i> mène à une augmentation du nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle.....	62
Figure 19 La délétion de <i>Dusp6</i> mène à une augmentation d'expression des marqueurs de différenciation des cellules de Paneth.....	63
Figure 20 La délétion de <i>Dusp6</i> mène à une augmentation des cellules intermédiaires	64
Figure 21 La morphologie des cellules de Paneth n'est pas altérée par la délétion de <i>Dusp6</i> ..	65
Figure 22 Augmentation de l'expression de la β -caténine dans l'épithélium iléal des souris invalidées pour <i>Dusp6</i>	67
Figure 23 Expression des transcrits de <i>DUSP6</i> chez les patients souffrant d'une maladie inflammatoire intestinale	70
Figure 24 Les souris invalidées pour <i>Dusp6</i> développent une colite moins sévère suite au traitement au DSS	71
Figure 25 La muqueuse colonique des souris invalidées pour <i>Dusp6</i> est moins affectée par le traitement au DSS	72

Figure 26 Maintien de l'hyperphosphorylation des ERK1/2 chez les souris invalidées pour <i>Dusp6</i> traitées au DSS.....	73
Figure 27 Les cellules Caco2/15 sous-exprimant <i>DUSP6</i> possèdent une meilleure capacité de réparation de blessure	74
Figure 28 Diminution de l'expression en ARNm de <i>DUSP6</i> dans des tumeurs colorectales humaines	78
Figure 29 Les souris <i>Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}</i> développent plus de polypes dans l'intestin grêle et dans le côlon	79
Figure 30 Augmentation de la phosphorylation de ERK2 et de la β -caténine dans les polypes de souris <i>Apc^{Min/+}</i>	80
Figure 31 Modulation de la phosphorylation des ERK1/2 dans les cellules cancéreuses colorectales sous-exprimant <i>DUSP6</i>	81
Figure 32 Les cellules HT29 sous-exprimant <i>DUSP6</i> possèdent une meilleure capacité de croître en indépendance d'ancrage et d'envahir le Matrigel	82
Figure 33 La capacité de croître en indépendance d'ancrage et d'envahir le Matrigel des cellules HCT116 n'est pas affectée par la baisse d'expression de <i>DUSP6</i>	83

Liste des abréviations

ADAM :	<i>A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
APC :	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
Atoh1 :	<i>Atonal homolog 1</i>
Bcl-2 :	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CBCC :	<i>Crypt-based columnar cells</i>
CCPA :	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CDKs :	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
Cdx2 :	<i>Caudal Type Homeobox 2</i>
CIN :	Voie de l'instabilité des chromosomes
CK1 α/δ :	<i>Casein kinase 1 α/δ</i>
DKK1 :	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
Dll4 :	<i>Delta-like 4</i>
DSS :	<i>Dextran Sulfate Sodium</i>
DUSPs :	<i>Dual-Specificity Phosphatases</i>
EGF :	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Elf3 :	<i>ETS-related transcription factor 3</i>
ERK1/2 :	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
Ets1 :	<i>E26 transformation-specific 1</i>
FAP :	Polypose adénomateuse familiale
GEF :	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GLP-1 :	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
GSK3 α/β :	<i>Glycogen synthase kinase 3 α/β</i>
Hes :	<i>Hairy enhancer of split</i>
hMLH1 :	<i>MutL homolog 1</i>
hMSH2 :	<i>MutS protein homolog 2</i>
HNPCC :	Cancer colorectal héréditaire sans polypose
IEC6 :	<i>Intestinal epithelial cell 6</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL1 β	Interleukine-1 β
IL-21	Interleukine-21
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinases</i>
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
JNK :	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KIM :	<i>Kinase interaction motif</i>
Klf4 :	<i>Kruppel-like factor 4</i>
Lgr5+ :	<i>Leucine-rich orphan G-protein coupled receptor 5</i>
Lkb1:	<i>Liver kinase B1</i>
LRP5/6 :	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
MALT :	<i>Mucosa-Associated Lymphatic Tissue</i>
MEK1/2 :	<i>MAPK/ERK Kinase 1/2</i>
MIP-3 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha</i>

MAPK :	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MKP :	<i>MAPK phosphatases</i>
MMR :	<i>Mismatch repair</i>
MSI :	<i>Voie de l'instabilité des microsatellites</i>
mTOR :	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	<i>bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium</i>
Muc2 :	<i>Mucin 2</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NES :	<i>Nuclear export signal</i>
Neurog3:	<i>Neurogenin 3</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor- κB</i>
NICD :	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NLRs :	<i>Nod-like receptors</i>
NLS :	<i>Nuclear localisation signal</i>
NOD2 :	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
Olfm4 :	<i>Olfactomedine 4</i>
PCP :	<i>Planar cell polarity</i>
PRR :	<i>Pattern recognition receptors</i>
Ptk6 :	<i>Protein tyrosine kinase 6</i>
RAF :	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RBPJ :	<i>Recombining binding protein suppressor of hairless</i>
RIP2	<i>Receptor-interacting protein 2</i>
RLRs :	<i>RIG-I-Like receptors</i>
RSK-1	<i>Ribosomal protein S6 kinase alpha-1</i>
SHP-2 :	<i>Src homology 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SMAD4/2 :	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4/2</i>
Sox9 :	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
Spdef :	<i>SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor</i>
TAK1	<i>TGF-β activated kinase</i>
TCF4 :	<i>T-cell factor 4</i>
Tff3 :	<i>Trefoil factor 3</i>
TGF β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLRs :	<i>Toll-like receptors</i>
TSLP :	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Wnt :	<i>Wingless/Int-1</i>
WTX :	<i>Wilms Tumor gene on the X-chromosome</i>
B-TrCP :	<i>β-transducin repeat containing</i>

Introduction

1. Le système digestif

1.1 Structure et fonction

Le système digestif peut être divisé en deux catégories d'organes, soit les organes du tube digestif et les organes digestifs annexes. Le tube digestif est un tube musculéux continu, ouvert sur l'extérieur, débutant à la bouche et se terminant à l'anus. Les organes du tube digestif sont, dans l'ordre, la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et finalement l'anus. Le tube digestif a pour rôle la digestion de la nourriture en molécules simples et l'absorption de ces molécules grâce à une muqueuse intestinale. Les organes digestifs annexes sont les dents, la langue, la vésicule biliaire, les glandes salivaires, le foie et le pancréas. Les glandes digestives annexes (glandes salivaires, foie et pancréas) ont notamment pour rôle la production de sécrétions servant à la digestion des aliments (Marieb et Hoehn, 2015).

Le processus de digestion se déroule en plusieurs étapes. La première étape est l'ingestion de la nourriture. Par la suite, cette nourriture sera propulsée de façon mécanique à travers le tube digestif par déglutition et par péristaltisme. Le péristaltisme est un processus de contractions et relâchements successifs des muscles de la paroi du tube digestif. Cette propulsion mécanique permet non seulement le déplacement de la nourriture, mais également un brassage du bol alimentaire. Ce bol alimentaire doit être digéré de façon mécanique et chimique. La digestion mécanique permet d'augmenter la surface de contact entre les enzymes et la nourriture ingérée. La mastication dans la bouche, le pétrissage de la nourriture dans l'estomac et la segmentation dans l'intestin grêle sont tous des processus de digestion mécanique. La digestion chimique est une dégradation catabolique des nutriments jusqu'à l'obtention de molécules simples. Cette digestion chimique débute principalement grâce à l'amylase salivaire sécrétée dans la salive par les glandes salivaires présentes dans la bouche. Elle enchaîne ensuite avec l'acide chlorhydrique et la pepsine présents dans l'estomac. Le bol alimentaire, alors appelé chyme, passe ensuite de l'estomac à l'intestin grêle où a lieu la majorité de la digestion chimique. En effet, la sécrétion dans l'intestin grêle de la bile a pour effet d'émulsionner les graisses et la sécrétion des proenzymes pancréatiques permet la digestion des nutriments. Finalement, les enzymes de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal permettent les dernières étapes de digestion des glucides et des protéines. Les molécules résultantes (vitamines, minéraux, eau et molécules simples) doivent ensuite être absorbées en passant de la lumière du tube digestif vers le sang ou la lymphe. Le processus d'absorption est possible grâce au transport actif ou passif de ces molécules au travers la muqueuse intestinale. Finalement, les substances non digestibles ou

non absorbées sont évacuées de l'organisme grâce à la défécation sous forme de fèces (Marieb et Hoehn, 2015).

Les parois du tube digestif sont composées de quatre couches principales soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (ou adventice). La muqueuse est la couche la plus interne. Elle est composée d'un épithélium, d'une lamina propria et d'une muscularis mucosae. Cet épithélium peut, selon la région du tube digestif, sécréter du mucus, des enzymes digestives et des hormones, absorber les produits de la digestion et protéger contre les maladies infectieuses. Le mucus sécrété par les cellules épithéliales est particulièrement important pour empêcher la digestion de certains organes par les enzymes digestives et pour faciliter le passage du bol alimentaire. La lamina propria est composée de tissu conjonctif lâche aréolaire. Elle contient plusieurs capillaires sanguins qui permettent l'absorption des nutriments dans le sang et la nutrition de l'épithélium. Elle contient également des MALT (*mucosa-associated lymphatic tissue*) qui contribuent à la défense contre les agents pathogènes. Finalement, la muscularis mucosae est une couche de cellules musculaires lisses permettant des mouvements locaux de la muqueuse. La sous-muqueuse est sous-jacente à la muqueuse et est composée de tissu conjonctif aréolaire. Elle contient plusieurs vaisseaux sanguins et lymphatiques et des follicules lymphoïdes. La musculuse est composée de deux couches (circulaire interne et longitudinale) et entoure la sous-muqueuse. Elle permet le péristaltisme et la segmentation. Finalement, la séreuse est la couche la plus externe. Elle est formée par le péritoine viscéral qui permet la facilitation du glissement des organes un sur les autres lors de leur fonctionnement (Marieb et Hoehn, 2015).

1.2 L'intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe principal de digestion et de l'absorption des nutriments. Il débute au sphincter pylorique et se termine à la valve iléocœcale. Il est composé de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum est le segment le plus court, mais est très important puisque c'est dans celui-ci que vont se déverser la bile produite par le foie et le suc pancréatique provenant du pancréas. Il y a peu de différences notables entre le jéjunum et l'iléon si ce n'est que le diamètre, l'épaisseur de la paroi et la longueur du segment (Marieb et Hoehn, 2015).

Pour faciliter l'absorption, l'intestin grêle est muni de plusieurs adaptations : les plis circulaires, les villosités et microvillosités. Les plis circulaires sont des replis de la muqueuse et de la sous-muqueuse qui favorisent le ralentissement du chyme au niveau du jéjunum. Ce ralentissement permet de faciliter le contact des nutriments avec la muqueuse. Les villosités sont des prolongements de la muqueuse qui deviennent de plus en plus étroits en avançant dans le tube digestif. Ces prolongements permettent

une plus grande surface d'absorption, tout comme les microvillosités. En effet, les microvillosités forment une bordure en brosse le long des cellules épithéliales permettant ainsi d'augmenter la surface de contact entre la membrane des cellules épithéliales et les nutriments contenus dans la lumière. Cette bordure en brosse est recouverte d'un glycocalyx contenant des enzymes qui, tel que mentionné ci-haut, permettent la digestion terminale des glucides et des protéines (Marieb et Hoehn, 2015).

1.2.1 L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est organisé sous forme d'axe crypte-villosité (Figure 1). Les cryptes de Lieberkühn sont des invaginations de l'épithélium se rendant jusqu'à l'intérieur de la sous-muqueuse. Ces unités permettent la protection des cellules contre le contenu de la lumière intestinale. Les cellules souches sont situées dans le fond de ces cryptes et bénéficient ainsi de sa protection et de signaux essentiels (Crosnier et al., 2006). Il y a deux types de cellules souches dans l'intestin, les CBCC (*crypt-based columnar cells*) ou Lgr5+ (*leucine-rich orphan G-protein coupled receptor*) et les cellules +4 ou cellules souches quiescentes. Les cellules Lgr5+ sont situées au fond des cryptes et sont responsables du renouvellement continu de l'épithélium. Les cellules en position +4 vont plutôt être quiescentes et à division lente. Elles auraient un rôle important lors de stress à l'épithélium et dans la réparation tissulaire (Carulli et al., 2014). Les cellules souches se divisent principalement de façon asymétrique, c'est-à-dire qu'elles donnent naissance à une cellule souche et à une cellule progénitrice (Barker et al., 2008). Cette dernière va proliférer plusieurs fois tout en migrant le long de l'axe crypte-villosité. Au fil de la migration, les cellules progénitrices vont se différencier en un des 4 types de cellules épithéliales intestinales. Ainsi, dans les villosités intestinales, on retrouve des cellules différenciées seulement. Lorsque ces cellules atteignent l'apex de la villosité, elles sont expulsées dans la lumière intestinale et finissent par mourir par anoikose (van der Flier et Clevers, 2009).

Il existe quatre types de cellules épithéliales différenciées dans l'intestin grêle provenant de deux lignées cellulaires: la lignée absorbante, soit les entérocytes, et la lignée sécrétrice composée des cellules entéroendocrines, des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (Medema et Vermeulen, 2011). Il existe aussi d'autres types cellulaires moins bien connus, soit les cellules M (Miller et al., 2007), les cellules Tuft (Gerbe et al., 2011) et les cellules Cup (Madara et Carlson, 1985)

Les entérocytes sont les cellules épithéliales les plus abondantes dans l'intestin. Leur principale fonction est l'absorption des nutriments. Les entérocytes sont des cellules polarisées. En effet, ils possèdent des microvillosités et une bordure en brosse sur leur membrane apicale permettant une

augmentation de la surface d'absorption (Noah et al., 2011). Ce sont également des cellules qui vont participer à la digestion chimique terminale des protéines et des glucides grâce aux enzymes de la bordure en brosse (Marieb et Hoehn, 2015).

Les cellules entéroendocrines représentent 1% des cellules épithéliales intestinales. Il existe jusqu'à 15 sous-types déterminés par leur morphologie et les hormones sécrétées (Schonhoff et al., 2004). La sécrétion d'hormones permet la régulation de plusieurs fonctions digestives telles que la digestion (van der Flier et Clevers, 2009). Les principales hormones sécrétées par les cellules entéroendocrines de l'intestin grêle sont la cholecystokinine, la sécrétine, la motiline, le GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*) et la neurotensine (Rindi et al., 2004).

Les cellules caliciformes, également surnommées cellules à mucus ou cellules à Gobelet, ont un rôle très important dans la protection contre la friction et les stress chimiques causés par le passage du bol alimentaire, mais également contre l'invasion de la muqueuse par les bactéries (Kim & Ho, 2010; van der Flier & Clevers, 2009). De plus, par la sécrétion des mucines et des peptides « trefoil », elles permettent également le mouvement efficace et la progression du contenu de la lumière intestinale (van der Flier et Clevers, 2009). Ce type cellulaire est le plus abondant de la lignée sécrétrice représentant 10 à 15% des cellules épithéliales intestinales (Noah et al., 2011).

Le dernier type cellulaire sécrétoire est un type très particulier, puisqu'il ne migre pas le long de l'axe crypte-villosité comme les autres cellules différenciées. En effet, les cellules de Paneth vont plutôt descendre dans le bas de la crypte pour aller se loger entre les cellules souches. Elles contiennent de larges granules à leur pôle apical contenant différents peptides antimicrobiens, tels que le lysozyme et les défensines (van der Flier et Clevers, 2009). Plus récemment, il a été démontré que les cellules de Paneth sont également très importantes pour le maintien de la niche des cellules souches. En effet, les cellules de Paneth fournissent les signaux essentiels au maintien des cellules souches notamment les facteurs de croissance EGF (*epidermal growth factor*) et Wnt3 (*wingless/int-1*) ainsi que le ligand Notch Dll4 (*delta-like 4*) (Sato et al., 2011).

1.3 Le côlon

Le côlon est l'organe responsable de l'absorption de la majeure partie de l'eau et de la défécation des déchets non-digestibles sous forme de fèces. Il débute à la valve iléocœcale et se termine à l'anus (Marieb et Hoehn, 2015).

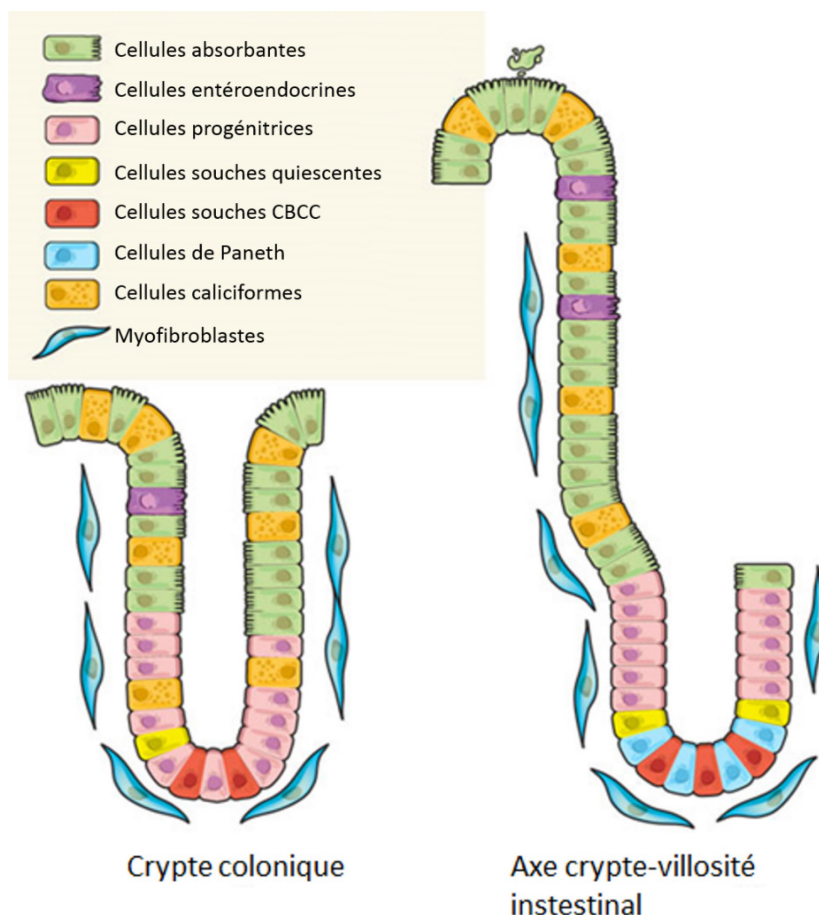


Figure 1 La structure de l'axe crypte-villosité intestinal et la crypte colique

L'intestin grêle (droite) est organisé sous forme d'axes crypte-villosité. Les cellules souches (CBCC et cellules souches quiescentes) sont localisées au fond de la crypte, adjacentes aux cellules de Paneth. Il existe 4 types cellulaires différenciés. Les cellules de Paneth, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines font partie de la lignée sécrétrice et les entérocytes font partie de la lignée absorbante. Le côlon (gauche) est organisé sous forme de cryptes dans laquelle se retrouvent tout au fond les cellules souches. Le côlon, contrairement à l'intestin grêle ne possède pas de cellules de Paneth, mais possède des cellules caliciformes et entéroendocrines, ainsi que des cellules absorbantes. Dans l'intestin grêle, comme dans le côlon, les cellules souches vont plus fréquemment se diviser de façon asymétrique pour donner naissance à une autre cellule souche et à une cellule progénitrice qui va proliférer plusieurs fois avant de se déterminer et de se différencier dans le haut de la crypte. Figure tirée et modifiée de (Medema et al. 2011).

Contrairement à l'intestin grêle, le côlon ne possède pas de villosités. De plus, les cellules de Paneth sont absentes du côlon. En effet, le côlon ne possède que deux types de cellules sécrétrices, soit les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines (Figure 1).

Les cellules caliciformes sont présentes en plus grande quantité dans le côlon que dans l'intestin grêle. En effet, elles représentent 16 à 20% de l'épithélium colique (Karam, 1999; Katz et al., 2002). Les cellules entéroendocrines sont, quant à elles, beaucoup moins présentes que dans l'intestin grêle (Rothenberg et al., 2012). Les cellules absorbantes du colon, les colonocytes, ont comme principale fonction l'absorption de l'eau et des électrolytes, plutôt que l'absorption des nutriments (Rindi et al., 2004).

2. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire

L'intestin est un organe à renouvellement rapide qui est renouvelé aux 4 à 5 jours. Cela en fait un tissu dont les cellules sont régulièrement en prolifération et en différenciation cellulaire. Les cellules souches donnent naissance aux cellules progénitrices qui se divisent de 4 à 5 fois avant de se déterminer et de se différencier (van der Flier et Clevers, 2009). Le renouvellement de l'épithélium est régulé très finement grâce à des signaux provenant de l'épithélium différencié, du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium et du microbiome de la lumière intestinale (Medema et Vermeulen, 2011).

2.1 La voie de signalisation *Wnt/β-caténine*

Les facteurs Wnts sont des glycoprotéines palmitoylées, modification post-traductionnelle essentielle pour sa reconnaissance par la cellule cible (Clevers et al., 2014). La protéine Porcupine, une O-acyltransférase du réticulum endoplasmique, est d'ailleurs nécessaire à cette modification post-traductionnelle et donc essentielle à la signalisation des Wnts (Hoffman, 2000)(Kadowaki et al., & Perrimon, 1996). Les facteurs Wnts sont sécrétés par les cellules de Paneth (Sato et al., 2011) et les cellules mésenchymateuses (Kabiri et al., 2014) dans l'intestin. À ce jour, trois voies de signalisation des Wnts sont connues, soit la voie canonique (Wnt/β-caténine), la voie non-canonique PCP (*Planar cell polarity*) et la voie Wnt/Ca²⁺ (Clevers, 2006). Les facteurs Wnts associés à la voie canonique Wnt/β-caténine (Wnt3, Wnt6 et Wnt9b) diminuent en concentration plus l'on monte de la crypte vers la lumière (Gregorieff et Wrana, 2016). Il a été démontré récemment que l'action de Wnt3, un des facteurs Wnt de la voie Wnt/β-caténine, requerrait un contact entre la cellule de Paneth et la cellule souche adjacente. En effet, Wnt3 ne serait pas sécrété par les vésicules de sécrétion des cellules de Paneth, mais plutôt transféré, par contact direct, à la cellule adjacente. (Farin et al., 2016).

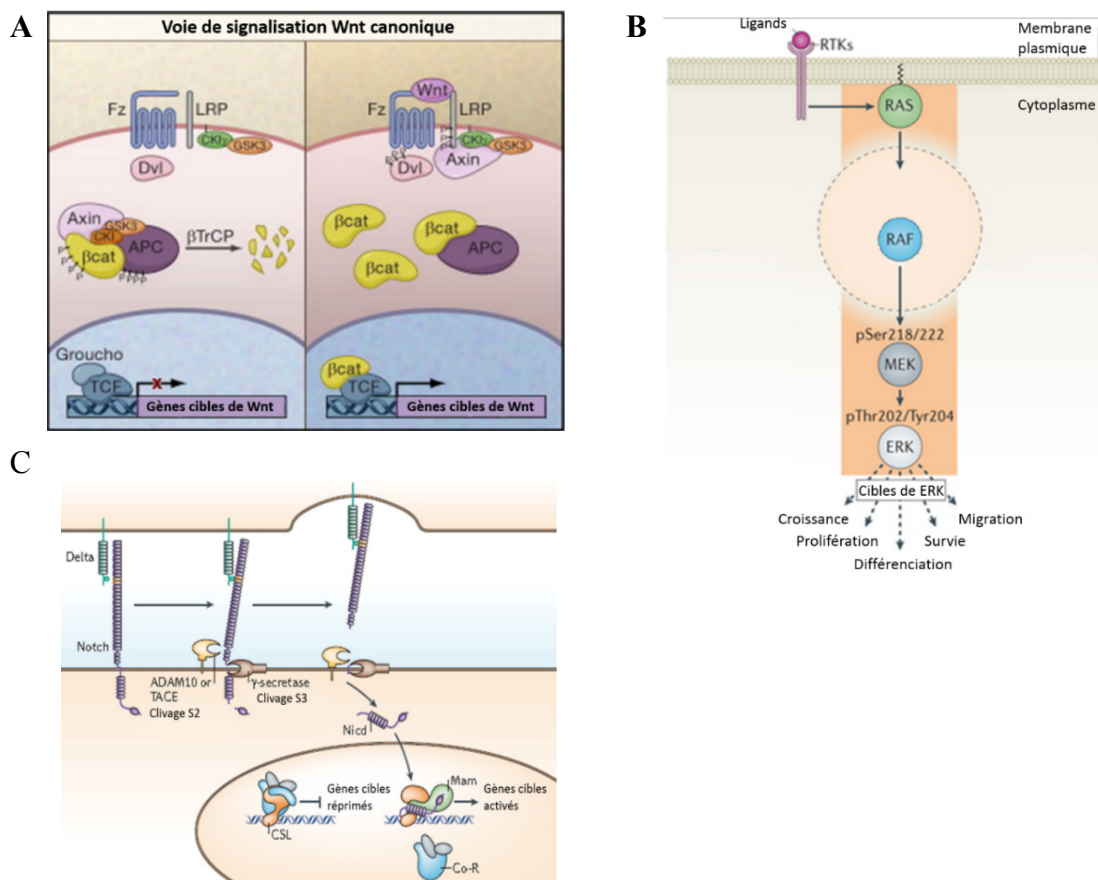


Figure 2 Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire

A. En absence de Wnt, les kinases CKI α et GSK3 β présentes dans le complexe de dégradation de la β -caténine phosphorylent celle-ci. Elle est par la suite ubiquitinée par la E3 ligase β TrCP, ce qui provoque son envoi vers le protéasome. En présence de Wnt, l'axine du complexe de dégradation est recrutée au co-récepteur LRP5/6 conduisant à la disruption du complexe de dégradation et à la phosphorylation de LRP5/6 par la CK1 γ et GSK3 β . La β -caténine n'est donc plus phosphorylée, ce qui conduit à sa stabilisation. Elle peut alors transloquer au noyau, se lier au facteur de transcription Tcf4 et induire la transcription de gènes cibles. **B.** La voie RAS-RAF-MEK-ERK est activée par des hormones, cytokines et surtout, par les facteurs de croissance classiques comme l'EGF et l'IGF-1. Bien que le mécanisme d'activation au niveau des récepteurs impliqués diffère, le signal converge vers l'activation de la petite protéine G Ras. Celle-ci active par la suite plusieurs effecteurs dont les plus connus, le MAP Kinase Kinase Kinases Raf. Celles-ci vont phosphoryler et activer les kinases à double spécificité MEK1/2. Ces deux kinases vont ensuite phosphoryler les sérine/thréonine kinases ERK1/2 sur un motif TXY. Les kinases ERK1/2 peuvent par la suite phosphoryler de nombreux substrats tant cytoplasmiques que nucléaires. **C.** La voie Notch est initiée par la liaison du ligand Delta (Delta-like ou Jagged chez les mammifères) d'une cellule au récepteur Notch de la cellule adjacente. Cela va entraîner un premier clivage du récepteur par ADAM10 et un deuxième clivage par la γ -sécrétase. Ce deuxième clivage va permettre le relâchement d'un fragment intracellulaire du récepteur appelé Nid1. Ce fragment peut par la suite transloquer au noyau et avec l'aide de CSL et Mastermind activer la transcription de gènes cibles. Figures tirées et modifiées de (Clevers, 2006)(Lavoie et Therrien, 2015)(Bray, 2006)

Les facteurs Wnts activant la voie canonique Wnt/ β -caténine doivent se lier au récepteur Frizzled qui possède sept passages transmembranaires (Bhanot et al., 1996) en présence du corécepteur LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*) (He et al., 2000; Pinson et al., 2000) (Figure 2). La principale protéine effectrice de la voie Wnt/ β -caténine est la β -caténine, particulièrement celle localisée au cytoplasme. La régulation de cette protéine s'effectue grâce à un complexe nommé complexe de dégradation. En absence des facteurs Wnts, la β -caténine est séquestrée dans ce complexe composé de la protéine d'échafaudage Axine, des suppresseurs de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*) et WTX (*wilms tumor gene on the X-chromosome*) et finalement, des sérine/thréonine kinases CK1 α/δ (*casein kinase 1 α/δ*) et GSK3 α/β (*glycogen synthase kinase 3 α/β*). Le suppresseur de tumeur APC interagit directement avec l'Axine et la β -caténine (Clevers et Nusse, 2012) alors que WTX favorise la dégradation de la β -caténine par un mécanisme restant à déterminer (Regimbald-Dumas et He, 2011). Les sérine/thréonine kinases CK1 α/δ et GSK3 α/β , en absence de Wnts, phosphorylent la β -caténine sur plusieurs résidus en N-terminal. Le motif de phosphorylation est ensuite reconnu par la protéine β -TrCP (*β -transducin repeat containing*) qui conduit à l'ubiquitination de la β -caténine et à sa dégradation dans le protéasome (Aberle et al., 1997) (Figure 2A).

En présence des facteurs Wnts (Figure 2), l'Axine du complexe de dégradation est recrutée au corécepteur LRP5/6 conduisant à la disruption du complexe et à la phosphorylation de LRP5/6 par la CK1 γ et GSK3 β . La β -caténine n'est donc plus phosphorylée, ce qui conduit à sa stabilisation. Elle peut alors transloquer au noyau, se lier au facteur de transcription TCF4 (*T-cell factor 4*) et induire la transcription de gènes cibles (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996).. En absence de signaux Wnt, TCF4 est inhibé par Groucho qui est déplacé par la β -caténine une fois la voie de signalisation active (Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998). Récemment, il a été démontré que l'inhibition de l'ubiquitination de la β -caténine permettait la saturation des complexes de dégradation et donc l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine (Li et al., 2012).

La signalisation Wnt est principalement connue pour son importance dans le maintien de la niche des cellules souches (Clevers et Nusse, 2012). Une étude a démontré que des souris invalidées pour les gènes *Tcf7/2* (l'équivalent de *TCF4* chez l'humain) perdaient leurs cellules souches intestinales (Korinek et al., 1998). De plus, l'inhibition de Wnt par l'expression transgénique de DKK1 (*dickkopf-related protein 1*), un antagoniste des corécepteurs LRP5/6, induit une perte presque complète des cryptes chez des souris adultes (Reya et Clevers, 2005). Dans ces deux modèles de souris, une diminution drastique de la prolifération a été aussi observée. Finalement, lorsque l'on active la voie

de signalisation des Wnts par l'entremise de l'expression transgénique d'un agoniste de cette voie, la R-Spondine, on peut observer une hyperprolifération cryptale (Kim et al., 2005).

La voie Wnt/ β -caténine est également bien connue pour son rôle dans la progression du cycle cellulaire. Parmi les gènes cibles de cette voie de signalisation, on peut notamment compter *Cycline D1* et *c-MYC* (Clevers, 2006). La cycline D1 est une protéine essentielle au déroulement de la phase G1 du cycle cellulaire et à l'entrée en phase S (Daksis et al., 1994). C-MYC est un facteur de transcription qui induit l'expression de plusieurs gènes associés au contrôle du cycle et de la survie cellulaire. De plus, c-MYC inhibe l'expression de deux inhibiteurs du cycle cellulaire, p21 et p27 (Gartel et al., 2001; Yang et al., 2001).

La voie Wnt/ β -caténine est également impliquée dans la position cellulaire à travers la crypte. En effet, le gradient Wnt présent dans la crypte permet un gradient des ligands Ephrine B1/B2 et des récepteurs EphB2 grâce à la régulation transcriptionnelle par le complexe β -caténine/TCF4 (Batlle et al., 2002; Xu et al., 1999). Ainsi, dans le fond de la crypte, l'expression du récepteur EphB2 est prédominante alors que dans le haut de la crypte, l'expression des ligands Ephrine B1/B2 est prédominante. L'effet répulsif de l'interaction entre le récepteur et son ligand permet la migration des cellules vers le haut de la villosité (Scoville et al., 2008). Comme les cellules de Paneth n'expriment pas de ligand Ephrine, ces cellules ne peuvent migrer vers le haut de la villosité et donc restent dans le bas de la crypte (Batlle et al., 2002).

Finalement, la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans le processus de différenciation cellulaire. En effet, les souris invalidées pour *Tcf4* possèdent des cellules caliciformes et des entérocytes, mais ne possèdent pas de cellules entéroendocrines (Korinek et al., 1998). Les souris transgéniques surexprimant DKK1 possèdent une absence quasi complète des cellules sécrétrices (Pinto et al., 2003). Cette voie de signalisation serait principalement impliquée dans la différenciation des cellules de Paneth notamment par l'induction de l'expression du gène cible de Sox9 (*SRY (sex determining region Y)-box 9*), une protéine nécessaire à la maturation des cellules de Paneth. En effet, les souris invalidées pour *Sox9* ne possèdent pas de cellules de Paneth (Mori-Akiyama et al., 2007) (Bastide et al., 2007).

2.2 La voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)/MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

La voie de signalisation ERK1/2/MAPK peut être activée par une grande variété de stimuli incluant des hormones, des cytokines et des facteurs de croissance (Zhang et al., 2002). Son activation a été

d'ailleurs grandement caractérisée suite à la liaison des facteurs de croissance à des récepteurs tyrosine kinases, notamment les récepteurs à l'EGF (Steelman et al., 2011), mais elle peut également être activée par des récepteurs couplés aux protéines G ou des intégrines. Bien que le mécanisme d'activation au niveau des récepteurs impliqués diffère, le signal converge vers l'activation de la petite protéine G Ras. Une fois activée, RAS (H-RAS, K-RAS ou N-RAS) active plusieurs effecteurs dont principalement les kinases RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) (A-RAF, B-RAF et C-RAF). Celles-ci phosphorylent les kinases à double spécificité MEK1/2 (*MAPK/ERK Kinase*). Finalement, ces deux kinases vont phosphoryler les sérine/thréonine kinases ERK1/2 sur le motif TXY permettant ainsi leur pleine activation (Ray et Sturgill, 1988; Roskoski, 2012a) (Figure 2B). Le substrat cytoplasmique le mieux connu des ERK1/2 est la kinase RSK1 (*ribosomal protein S6 kinase alpha-1*), kinase qui phosphoryle plusieurs substrats à son tour (Anjum et Blenis, 2008). Activées, les kinases ERK1/2 peuvent aussi transloquer au noyau et phosphoryler plusieurs facteurs de transcription tels que ELK1 (*ETS domain-containing protein 1*), c-FOS et c-MYC (Hollenhorst et al., 2011; Murphy & Blenis, 2006) induisant leur stabilité et/ou leur activité transcriptionnelle. L'activation de cette cascade de signalisation est impliquée dans le contrôle de nombreux processus cellulaires notamment l'adhésion, la prolifération/progression du cycle cellulaire, la migration, la survie et la différenciation (Roskoski, 2012b).

Plusieurs travaux suggèrent l'implication de la voie ERK/MAPK dans le contrôle de la prolifération cryptale intestinale. Tout d'abord, notre groupe a démontré dans l'intestin fœtal humain que les formes phosphorylées et actives des ERK1/2 sont principalement retrouvées dans le noyau des cellules cryptales intestinales (Aliaga et al., 1999). Il a notamment été démontré que ces kinases permettaient la transition G1/S du cycle cellulaire en induisant la dégradation de l'inhibiteur des complexes cycline/cdk (*cyclin-dependent kinase 2*) p27^{Kip1} (Rivard et al., 1999). Plus important encore, il a été démontré que l'activation des kinases ERK1/2 était nécessaire à l'entrée en phase S et donc à la prolifération cellulaire dans les cellules épithéliales intestinales en culture (Aliaga et al., 1999, Rivard 1999). De manière intéressante, l'hyperactivation des ERK1/2 par l'expression d'un MEK1 constitutif actif augmente l'expression de la cycline D1 et permet l'entrée en phase S en absence de facteurs de croissance (Rivard et al., 1999) (Voisin et al., 2008). Plus récemment, notre groupe a démontré que l'activation des ERK1/2 augmentait la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription E2F4 (Paquin et al., 2013), un facteur de transcription qui est important pour l'expression de gènes nécessaires à la phase S des cellules cryptales intestinales (Garneau et al., 2009). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les ERK1/2 sont des acteurs clés dans la progression du cycle cellulaire des cellules de l'épithélium intestinal. Finalement, plus récemment, dans un modèle d'organoïdes, il a été démontré qu'en inhibant la voie ERK/MAPK, les

cellules souches Lgr5+ (cellules souches CBCC) entrent en quiescence. Ainsi, la voie ERK/MAPK est aussi importante pour l'induction du cycle cellulaire dans les cellules souches Lgr5+ (Basak et al., 2017).

Il a également été mis en évidence que les kinases ERK1/2 jouent un rôle dans l'inhibition de la différenciation cellulaire. En effet, en activant ERK1/2 grâce à un MEK1 constitutif actif, la différenciation en entérocytes est inhibée (Lemieux et al., 2011). De plus, il a été démontré que l'expression de l'oncogène KRAS ou d'un MEK constitutif actif dans des souris provoquait la perte des cellules de Paneth, perte qui pouvait être en partie restaurée par l'inhibition des kinases à double-spécificité MEK1/2 (Y. Feng et al., 2011)(Heuberger et al., 2014). Au contraire, la différenciation des cellules caliciformes semble quant à elle positivement contrôlée par la voie Ras/MAPK (Feng et al., 2011)(Yamashita et al., 2014)(Heuberger et al., 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modulations de différenciation restent à caractériser.

2.3 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch débute avec la liaison d'un ligand, soit Delta-like ou Jagged à un récepteur Notch (Notch 1 à 4). Les ligands Notch sont spéciaux puisque ce sont des ligands transmembranaires. La signalisation Notch implique donc un contact entre une cellule exprimant un ligand Notch et une cellule exprimant un récepteur Notch. Suite à cette liaison, il y aura un premier clivage par une métalloprotéase de la famille ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*). Un deuxième aura lieu grâce à une γ -sécrétase, ce qui va libérer NICD (*Notch intracellular domain*). Ce fragment pourra ensuite transloquer au noyau et coopérer avec la protéine RBPJ (*recombining binding protein suppressor of hairless*) et son co-activateur Mastermind pour promouvoir la transcription de gènes cibles (Bray, 2006)(Sancho et al., 2015) (Figure 2C). La famille de gènes activés par la voie Notch la plus connue est la famille *Hes* (*Hairy enhancer of split*). Elle est composée des répresseurs transcriptionnels *Hes1*, *Hes5* et *Hes7* (Fischer et Gessler, 2007).

La voie Notch dans l'épithélium de l'intestin est principalement connue pour son implication dans la différenciation cellulaire. En effet, une cellule recevant le signal Notch, et donc exprimant le récepteur Notch, va pouvoir se déterminer en cellule de la lignée absorbante. Une cellule émettant le signal Notch, et donc exprimant le ligand Notch, va pouvoir se déterminer en cellule de la lignée sécrétrice (Sancho et al., 2015). Plus important encore, la forte présence de ligands Notch dans une cellule va favoriser l'inhibition de l'expression de ligands Notch chez la cellule avoisinante. Ce mécanisme permet de favoriser l'alternance entre une cellule démontrant de forts niveaux d'activation de la voie Notch et une cellule démontrant de faibles niveaux d'activation de la voie.

Cette inhibition latérale est très importante dans le maintien de la balance lignée absorbante versus lignée sécrétrice (Lewis, 1998). Le facteur de transcription responsable de la détermination en lignée sécrétrice est Atoh1 (*atonal homolog 1*) (ou Math1) (VanDussen et Samuelson, 2010)(Archer, 2001)(Shroyer et al., 2007). Ce facteur de transcription est inhibé par le répresseur transcriptionnel induit par l'activation de Notch, Hes1 (Fre et al., 2005). Ainsi, l'activation de la voie Notch permet l'inhibition de la détermination en cellule sécrétrice. Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibition de la voie de signalisation Notch par un modèle de délétion conditionnelle inductible dans l'épithélium intestinal du gène *Rbp-j*, codant pour la protéine RBPJ, ou par l'utilisation d'un inhibiteur de la γ -sécrétase (DBZ) mène à une augmentation drastique du nombre de cellules caliciformes (van Es et al., 2005; van Es et al., 2010). Ce phénotype serait dépendant de Math1 (ou Atoh1) puisqu'une inhibition conjointe de la voie de signalisation Notch par le DBZ avec une délétion conditionnelle inductible dans l'épithélium intestinal de Math1 empêche l'augmentation du nombre de cellules caliciformes induite par la signalisation Notch (van Es et al., 2010).

La voie Notch joue également un rôle dans le maintien des cellules souches. En effet, les cellules souches CBCC démontre une forte signalisation Notch. Inhiber la voie Notch, soit par inhibition de la γ -sécrétase, par la délétion de la protéase ADAM10 ou par l'inactivation génétique des ligands Dll1 et 4, diminue les marqueurs de cellules souches CBCC Olfm4 (Olfactoméline 4) et Lgr5 et induit une perte des cellules souches CBCC avec le temps (Pellegrinet et al., 2011; Riccio et al., 2008; Tsai et al., 2014).

La voie Notch joue un rôle dans le maintien des cellules souches notamment en stimulant la prolifération cellulaire. En effet, la signalisation Notch est élevée dans les cellules souches, mais également dans les progéniteurs des cellules absorbantes, cellules proliférant plus que les cellules progénitrices sécrétrices (Sancho et al., 2015). La voie Notch promeut notamment la prolifération en inhibant la transcription des inhibiteurs du cycle cellulaire p27 et p57 (Riccio et al., 2008).

2.4 La détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales

Tel qu'abordé plus tôt, les cellules souches de l'intestin ont la capacité de se diviser et de donner naissance à des cellules filles qui vont pouvoir se déterminer et se différencier en quatre principaux types cellulaires : les entérocytes ou colonocytes de la lignée absorbante ainsi que les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines de la lignée sécrétrice. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans ce processus notamment la voie Wnt/ β -caténine, la voie Notch et la voie ERK1/2/MAPK. Ces voies de signalisation vont notamment influencer la

différenciation par la régulation de l'expression et/ou de l'activité de facteurs de transcription ou de répresseurs transcriptionnels (Figure 3).

Pour favoriser la lignée absorbante, donc les entérocytes, l'activation de la voie Notch est nécessaire. En effet, le répresseur transcriptionnel Hes1 inhibe l'expression de Atoh1, facteur nécessaire à la détermination en lignée sécrétrice (Figure 3). Ainsi, la voie Notch favorise la différenciation entérocytaire en inhibant la détermination en cellules sécrétrices (Kazanjian et al., 2010; Kim & Shivdasani, 2011). Aussi, d'autres facteurs seraient nécessaires pour la différenciation des cellules absorbantes. Il semblerait que le facteur ELF3 (*ETS-related transcription factor*) jouerait un rôle dans la différenciation des entérocytes. En effet, la délétion de *Elf3* dans des souris mène à une perte de la polarisation des entérocytes et n'ayant pas atteint la maturité (Ng et al., 2002). De plus, la maturation des entérocytes est retardée dans des souris invalidées pour *Ptk6* (*protein tyrosine kinase 6*), suggérant un rôle de cette protéine dans la maturation entérocytaire (Haegebarth et al., 2006). Finalement, le facteur de transcription Cdx2 (*caudal type homeobox 2*) serait également impliqué dans la différenciation en entérocytes. Une étude a démontré qu'en surexprimant Cdx2 de façon transgénique dans l'estomac de souris, l'épithélium gastrique adopte des caractéristiques d'épithélium intestinal, avec entre autres des microvillosités et la capacité de digérer des disaccharides (Mutoh et al., 2005).

La délétion embryonnaire ou à l'âge adulte de Atoh1 dans des souris démontre que ce facteur de transcription est essentiel à la différenciation des cellules sécrétrices (Shroyer et al., 2007)(Yang et al., 2001). Tel que mentionné ci-haut, la voie Notch contrôle l'expression de Atoh1 grâce au répresseur transcriptionnel Hes1 qui empêche son expression. La voie Notch n'est pas la seule à contribuer à la baisse des niveaux de Atoh1. En effet, la voie Wnt/ β -caténine régule également les niveaux de Atoh1. GSK3- β est capable de phosphoryler Atoh1 qui mènera à la dégradation. Lorsque la voie de signalisation Wnt est inactive, la GSK3- β va plutôt phosphoryler la β -caténine et donc épargner Atoh1 qui ne sera pas dégradée (Leow et al., 2004; Peignon et al., 2011; Tsuchiya et al., 2007).

Neurog3 (Neurogénine 3) serait responsable de la détermination des cellules entéroendocrines (Figure 3). L'expression ectopique de Neurog3 dans l'embryon est suffisante pour favoriser la lignée entéroendocrine au détriment des cellules caliciformes (López-Díaz et al., 2007). Pour générer les différents sous-types de cellules entéroendocrines, plusieurs gènes doivent être mobilisés. Par exemple, l'expression de NeuroD1 induit la différenciation terminale en sous-types produisant la sécrétine et la cholécystokinine, suite à la détermination en cellule entéroendocrine par Neurog3

(Naya et al., 1997). Il a été démontré en organoïdes qu'en inhibant de façon combinée la voie Notch, ERK/MAPK et Wnt, les cellules se différencient en cellules entéroendocrines (Basak et al., 2017).

Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth possèdent un précurseur commun induit par Gfi1. Tout comme la voie Notch régule la balance des cellules absorbantes versus les cellules sécrétrices, ce facteur de transcription est responsable de la balance entre les cellules entéroendocrines et les cellules caliciformes/Paneth (Shroyer et al., 2005). Spdef (*SAM pointed domain containing ETS Transcription Factor*) serait également impliqué dans la maturation des cellules de Paneth et des cellules caliciformes (Gregorieff et al., 2009; Noah et al., 2010) (Figure 3). Finalement, la délétion de *Lkb1* (*liver kinase B1*) augmente la quantité de cellules dites «intermédiaires» qui possèdent des caractéristiques des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (Shorning et al., 2009).

La délétion embryonnaire de Klf4 (Kruppel-like factor 4) cause une différenciation anormale des cellules caliciformes qui persiste à l'âge adulte (Ghaleb et al., 2011). Par contre, la délétion de Klf4 à l'âge adulte n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules caliciformes (Pellegrinet et al., 2011). En exprimant l'oncogène KRAS ou un MEK constitutif actif dans des souris, il est possible de promouvoir la différenciation des cellules caliciformes, suggérant ainsi un rôle positif de la voie ERK/MAP kinase dans la différenciation des cellules caliciformes (Feng et al., 2011)(Yamashita et al., 2014)(Heuberger et al., 2014). De plus, la voie Notch jouerait un rôle inhibiteur sur la différenciation des cellules caliciformes, notamment en inhibant l'expression de Klf4 (Ghaleb et al., 2008; van Es, van Gijn, et al., 2005).

Les cellules de Paneth sont principalement associées à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Ce sont les seules cellules épithéliales intestinales différenciées chez lesquelles il est possible d'observer une expression de la β -caténine nucléaire. De plus, leur différenciation dépend de la voie Wnt/ β -caténine. La réduction de l'activité de la β -caténine mène à une inhibition de la différenciation des cellules de Paneth (Andreu et al., 2008; Wang et al., 2007). Plus précisément, cette voie de signalisation mène à la maturation des cellules de Paneth (van Es Jay et al., 2005). La délétion de Sox9 mène à l'ablation complète des cellules de Paneth, confirmant ainsi l'implication de ce facteur de transcription induit par la voie Wnt/ β -caténine dans la détermination des cellules de Paneth (Bastide et al., 2007; Blache et al., 2004; Mori-Akiyama et al., 2007). La voie de signalisation ERK/MAPK aurait un rôle dans l'inhibition de la détermination des cellules de Paneth, puisque l'expression de l'oncogène KRAS dans des souris provoque la perte des cellules de Paneth (Y. Feng et al., 2011)(Heuberger et al., 2014).

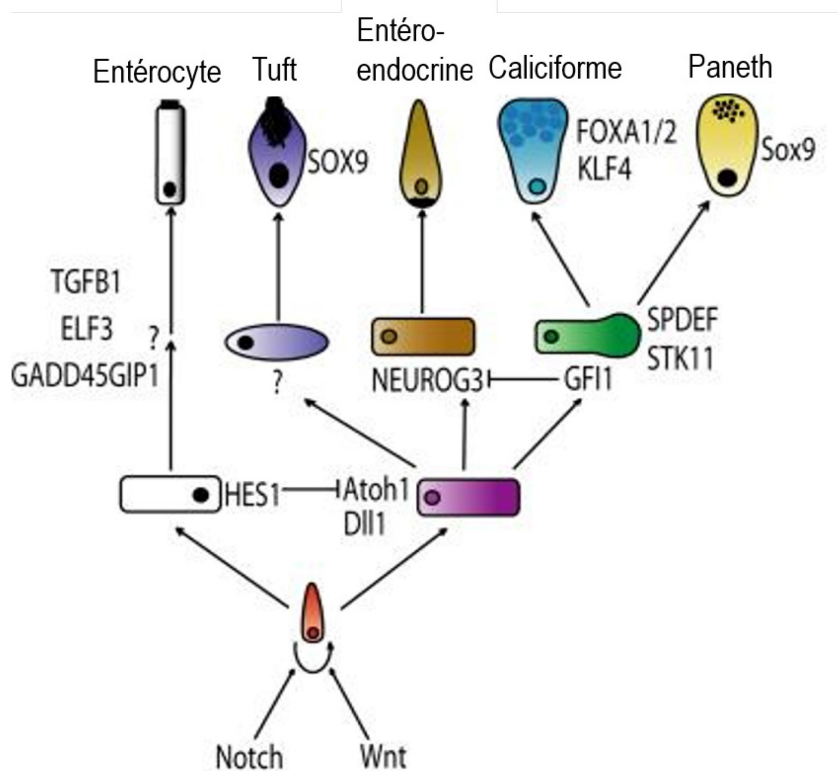


Figure 3 Détermination et différenciation des cellules épithéliales intestinales

La voie de signalisation Notch permet l'inhibition de Atoh1 grâce à l'induction de l'expression du répresseur transcriptionnel Hes1. Ainsi, la voie Notch favorise la lignée absorbante (blanc). Les entérocytes peuvent se différencier de façon terminale entre autres grâce à la protéine Elf3. L'expression de Atoh1 permet de favoriser la lignée sécrétrice (violet). Par la suite, une cellule peut se déterminer en cellule entéroendocrine grâce à la protéine Neurog3 (brun) ou devenir une cellule précurseur des cellules de Paneth et des cellules caliciformes (vert). Gfi1 serait responsable de la détermination en cellule précurseur en inhibant Neurog3. Par la suite, une cellule peut soit exprimer Klf4 pour devenir une cellule caliciforme (bleu), soit exprimer Sox9 pour devenir une cellule de Paneth (jaune). Figure tirée et modifiée de (Noah et al., 2011)

3. Les maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires intestinales sont des désordres inflammatoires chroniques du tractus digestif (Kaser et al., 2010). Il existe deux types de maladies inflammatoires intestinales : la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Podolsky, 2002). Le Canada est le pays possédant le plus de cas de maladies inflammatoires intestinales. 233,000 Canadiens étaient atteints d'une maladie inflammatoire intestinale en 2012 ce qui correspond à une prévalence de 0,67% (Rocchi et al., 2012). De plus, l'incidence de ces maladies est en augmentation (Molodecky et al., 2012). L'inflammation peut affecter tout le tractus gastro-intestinal dans la maladie de Crohn. Par contre, la section principalement affectée est l'iléon terminal. L'inflammation est segmentée, affectant par section le tractus digestif et est généralement transmurale (Xavier et Podolsky, 2007). L'inflammation dans la colite ulcéreuse se limite au côlon. Cette inflammation est caractérisée par la présence de plusieurs ulcères et affecte principalement la muqueuse colique. La colite ulcéreuse est également caractérisée par une perte des cellules caliciformes et par une infiltration de neutrophiles dans la muqueuse qui forment des abcès de cryptes (Xavier et Podolsky, 2007).

Les maladies inflammatoires intestinales sont considérées comme des maladies multifactorielles dépendant principalement de quatre facteurs : la prédisposition génétique (incluant les mutations de gènes impliqués dans le contrôle de la barrière épithéliale intestinale), le système immunitaire de l'hôte, le microbiote et les facteurs environnementaux (Hill et Artis, 2010).

3.1 *Le microbiote intestinal*

L'intestin grêle et le côlon accueillent une flore commensale composée d'approximativement 10^{11} - 10^{14} microorganismes. Les bactéries de la flore commensale jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale. En effet, elles affectent entre autres le développement du système immunitaire, la digestion des nutriments et la modulation du métabolisme (Abraham & Cho, 2009; Bäckhed et al., 2005).

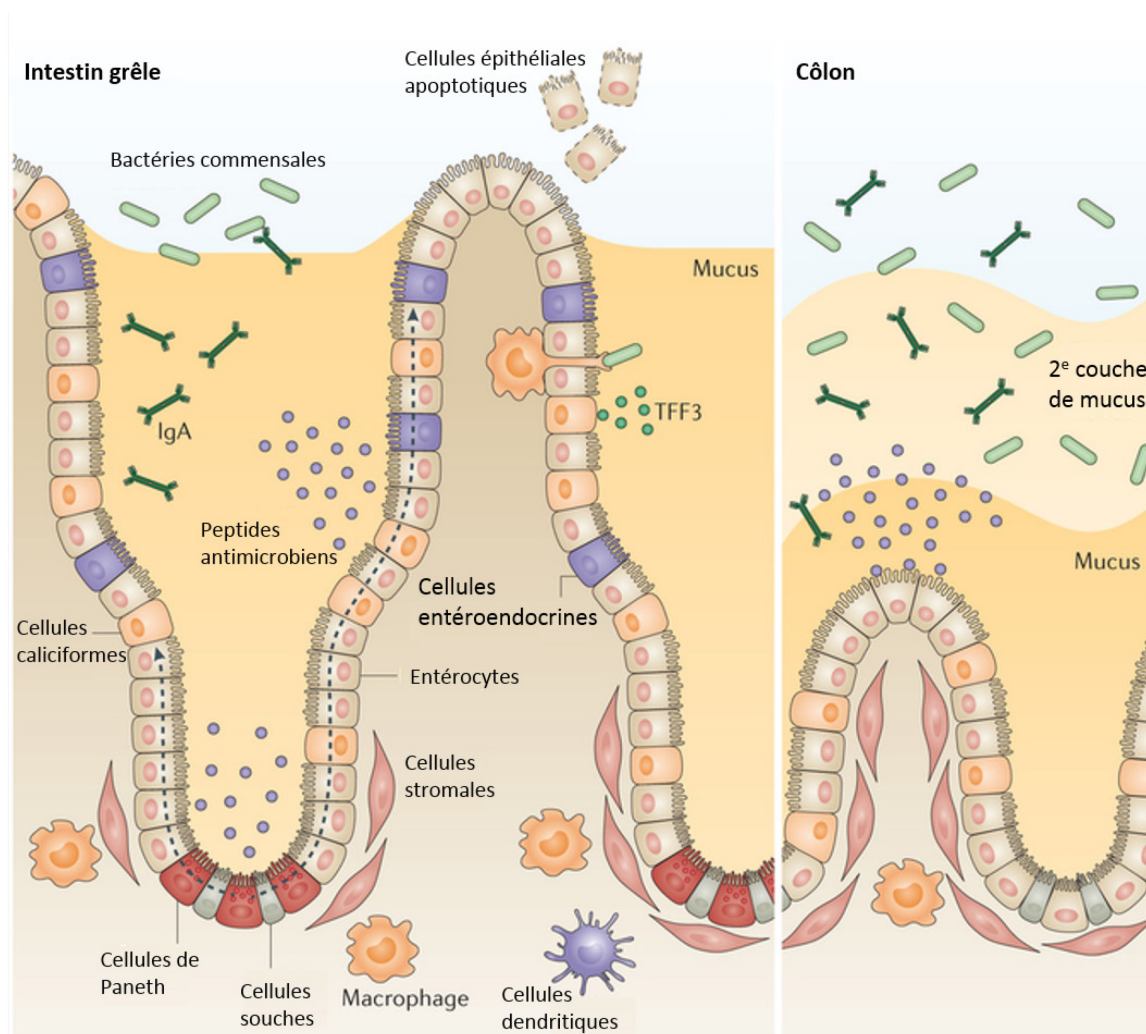


Figure 4 Barrière épithéliale intestinale

Le microbiote intestinal est très important pour le bon fonctionnement de l'intestin. Par contre, pour permettre une homéostasie intestinale, plusieurs mécanismes sont présents. Il existe 3 types de barrières épithéliales intestinales : la barrière physique, la barrière biochimique et la barrière immunitaire. La barrière physique est composée des cellules épithéliales intestinales. Elle est possible grâce aux jonctions serrées qui permettent un contrôle sélectif de la perméabilité intestinale. La barrière biochimique est composée du mucus sécrété par les cellules à mucus, ainsi que des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth. Finalement, la barrière immunitaire est possible grâce aux cellules M qui sondent le contenu de la lumière intestinale et grâce aux cellules épithéliales qui en réponse aux signaux bactériens sécrètent des facteurs tels que le TSLP et le $\text{TGF}\beta$ qui permettent le développement des cellules dendritiques et des macrophages pour favoriser la tolérance bactérienne. Figure tirée et modifiée de (Peterson & Artis, 2014)

Par contre, bien que les bactéries commensales soient essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale, plusieurs évidences suggèrent leur rôle dans l'initiation et le maintien des maladies inflammatoires intestinales. En effet, le traitement des personnes atteintes d'une maladie inflammatoire intestinale avec des antibiotiques est efficace, du moins à court terme (Khan et al., 2011). De plus, lorsque certains modèles expérimentaux de souris développant des pathologies inflammatoires intestinales, tels que les souris invalidées pour *Il10* ou *Il2*, sont élevés dans un milieu exempt de germes, le développement de l'inflammation est inhibé (Contractor et al., 1998; Sellon et al., 1998). Finalement, les personnes atteintes d'une maladie inflammatoire intestinale démontrent une altération dans la composition de leur flore intestinale (dysbiose) avec notamment une augmentation du ratio *Entérobactériacae/Firmicutes* (Frank et al., 2007; Gophna et al., 2006; Manichanh, 2006; Peterson et al., 2008; Scanlan et al., 2006).

3.2 La barrière épithéliale intestinale

L'intestin grêle et le côlon sont tous deux adaptés pour accueillir une flore commensale extrêmement riche et diversifiée. Par contre, il est bien important que l'homéostasie entre ces bactéries et l'hôte soit conservée pour éviter l'apparition d'inflammation ou d'infections. Les cellules épithéliales protègent l'intestin de ces menaces grâce à leurs propriétés de barrière physique, biochimique et immunitaire (Peterson & Artis, 2014).

3.2.1 La signalisation PRR (*Pattern recognition receptors*)

Les cellules épithéliales intestinales expriment des récepteurs nommés PRR (*Pattern recognition receptors*). Il existe trois types de récepteurs soit les TLRs (*Toll-like receptors*), les NLRs (*Nod-like receptors*) et les RLRs (*RIG-I-Like receptors*). Ces récepteurs échantillonnent le contenu de la lumière intestinale pour permettre l'intégration de signaux provenant des bactéries et pour permettre la réponse associée au signal, soit une réponse anti-microbienne ou immunorégulatrice.

Suite à l'activation d'un récepteur TLR, MYD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) est recruté au récepteur. Suite au recrutement de Myd88, un complexe formé de différentes protéines adaptatrices est formé, telles que les protéines IRAK (*IL-1 receptor associated kinases*), TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) et TAK1 (*TGF- β activated kinase*). La formation de ce complexe permet notamment l'activation des MAP kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et p38 qui par la suite vont phosphoryler différentes cibles dont des facteurs de transcription. Ce complexe permet également d'envoyer à la dégradation I κ B (*inhibitor of kappa B*) grâce à l'activation d'IKK (*IkappaB kinase*). L'envoi à la dégradation d'I κ B permet le relâchement du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) et ainsi sa translocation au noyau. L'activation de ces voies de signalisation

permet la transcription de différents gènes impliqués dans la réponse immunitaire et dans la prolifération et la survie cellulaire. NF- κ B est notamment connu pour l'induction de la transcription de différentes cytokines telles qu'IL-2 et IL-6 et dans l'induction de gènes impliqués dans la prolifération tels que les gènes *cyclinD1* et *c-Myc* (Li et al., 2010). Des études sur les TLRs ont mis en évidence le rôle protecteur de ces récepteurs. En effet, des résultats obtenus chez des souris déficientes en TLR2/4 ont démontré que les signaux envoyés par la flore commensale contribuent à l'homéostasie intestinale et à la régénération épithéliale suite à un stress tel qu'un traitement un DSS (Dextran Sulfate Sodium) qui induit une colite chimique (Rakoff-Nahoum et al., 2004)

Les NLRs sont des récepteurs intracellulaires qui jouent un rôle important dans l'immunité innée. Ces récepteurs jouent un rôle de plateforme de signalisation grâce à leur rôle de protéine d'échafaudage. Les deux récepteurs NLRs les mieux caractérisés sont les récepteurs NOD1 et NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 1* et 2). Lorsque ces derniers sont activés, ils peuvent, grâce à leur rôle de protéine d'échafaudage, mener à l'activation de RIP2 (*receptor-interacting protein 2*) qui à son tour permet l'activation de IKK, qui envoie à la dégradation I κ B et permet le relâchement de NF κ B. De plus, la signalisation des NOD permet l'activation des MAP kinases JNK, p38 et ERK1/2 (Franchi et al., 2009). Tel que mentionné ci-haut, ces voies de signalisation permettent la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la prolifération et la survie cellulaire. Les NLRs ont également été identifiés comme étant importants dans la régulation des maladies inflammatoires intestinales. En effet, NOD2 a été le premier gène de susceptibilité à la maladie de Crohn identifié (Hugot et al., 2001; Khor et al., 2011; Ogura et al., 2001).

3.2.2 Barrière physique

Les cellules épithéliales intestinales constituent également une barrière physique entre la lumière intestinale et la sous-muqueuse. Les jonctions serrées et adhérentes sont essentielles pour empêcher l'invasion de la sous-muqueuse par des bactéries ou le contenu intestinal. La perte de l'intégrité de cette barrière est un des mécanismes connus de l'initiation et de la propagation de l'inflammation intestinale (Sartor, 2006). Des souris exprimant une protéine possédant une mutation dominante négative de la N-cadhérine, une protéine impliquée dans les jonctions d'adhérence, développent spontanément une entérite apparentée à une maladie inflammatoire intestinale (Hermiston et Gordon, 1995).

3.2.3 Barrière biochimique

Les cellules caliciformes constituent la première ligne de défense contre les bactéries pathogènes ou commensales. Ces cellules sécrètent un épais mucus composé principalement de mucines hautement

glycosylées (Peterson & Artis, 2014). Il existe une couche de mucus au niveau de l'intestin grêle et deux couches de mucus au niveau du côlon : la couche externe et la couche interne. La couche externe est composée d'un gel épais qui contient des mucines sécrétées et la couche interne est un glycocalyx dense de mucines ancrées à la membrane (Artis, 2008; Hooper et Macpherson, 2010). La principale mucine sécrétée dans l'intestin grêle et le côlon est la mucine 2 (Muc2) (Johansson et al., 2008). Les souris invalidées pour Muc2 développent une colite spontanée confirmant le rôle protecteur du mucus (Van der Sluis et al., 2006). Les cellules caliciformes sécrètent également d'autres molécules participant à l'installation d'une barrière biochimique, notamment Tff3 (*trefoil factor 3*). Tff3 permet l'établissement d'une intégrité structurale du mucus et favorise la réparation tissulaire et la migration des cellules épithéliales (Dignass, et al., 1994; Taupin et al., 2000).

Les cellules de Paneth participent de façon active à la barrière biochimique. Elles peuvent sécréter plusieurs peptides antimicrobiens tels que le lysozyme, les défensines et les cathélicidines. Les peptides antimicrobiens permettent de contrôler la flore commensale au niveau de sa composition et de sa distribution le long du tube digestif (Peterson & Artis, 2014). Dans la maladie de Crohn, des anomalies au niveau des cellules de Paneth seraient un événement précoce pour le développement de l'inflammation (Kaser & Blumberg, 2010).

3.2.4 Barrière immunitaire

Les cellules M jouent un rôle très important dans la barrière immunitaire. Ces cellules peuvent échantillonner les bactéries dans la lumière intestinale pour présenter des antigènes aux cellules immunitaires présentes dans la sous-muqueuse (Mabbott, et al., 2013). Ce mécanisme est très important pour la reconnaissance des pathogènes et pour le développement d'une tolérance aux bactéries commensales (Peterson & Artis, 2014).

De plus, les cellules épithéliales intestinales sécrètent des facteurs tels que TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), le TGF β (*transforming growth factor- β*) et l'acide rétinoïque qui favorisent le développement des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes) et des macrophages. Ces facteurs sont sécrétés en réponse à des signaux dérivés des bactéries et vont promouvoir la tolérance bactérienne (Rimoldi et al., 2005; Taylor et al., 2009; Zeuthen et al., 2008).

3.2 La voie ERK/MAPK dans les maladies inflammatoires intestinales

Peu d'études ont été effectuées sur le rôle des ERK1/2 dans les maladies inflammatoires intestinales. Selon le cas, un rôle pro-inflammatoire ou un rôle anti-inflammatoire a été attribué à ces kinases. Certains groupes ont démontré une implication de la signalisation ERK1/2 dans la médiation de

certaines voies de signalisation de cytokines telles qu'IL-21 et IL-1 β (Interleukine-21, -1 β) (Caruso et al., 2007; Kwon et al., 2007). En effet, l'induction d'IL-21 favoriserait la migration des lymphocytes, processus dépendant de la signalisation ERK1/2 qui induirait l'expression de MIP-3 α (*Macrophage Inflammatory Protein-3*) (Caruso et al., 2007). Ainsi, la signalisation ERK1/2 peut favoriser l'action pro-inflammatoire de certaines cytokines.

De plus, il y a une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 dans des tissus de patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale (Dahan et al., 2008; Waetzig et al., 2002) ce qui pourrait suggérer un rôle de la signalisation ERK1/2 dans la perpétuation de l'inflammation intestinale. À l'inverse, par l'induction de facteurs de transcription tels que Elk1, Ets1 (E26 transformation-specific 1) et c-myc, les kinases ERK1/2 participent au processus de résolution de l'inflammation en promouvant la prolifération et la migration cellulaire (Delaney et al., 2008; Grund et al., 2005; Guha et al., 2001). Ainsi, l'activation des ERK1/2 est fort probablement impliquée dans le processus de régénération de l'épithélium. Une étude a d'ailleurs démontré le potentiel protecteur de cette voie du moins dans l'épithélium intestinal. En effet, les auteurs ont rapporté que les souris comportant une délétion conditionnelle de *Raf1* dans l'épithélium intestinal développent une colite plus sévère que les souris contrôles en réponse au DSS. Cette étude a également montré que le rôle protecteur de Raf1 passait notamment par l'induction d'une hyperprolifération en réponse aux dommages induits par l'inflammation. Finalement, ce groupe a démontré que Raf1 était également important dans la protection de l'épithélium contre l'apoptose induite par le traitement au DSS (Edelblum et al., 2008).

Notre laboratoire a récemment mis en évidence dans un modèle de délétion conditionnelle à l'épithélium intestinal de *Shp-2* (*src homology 2 domain-containing phosphatase 2*) que la voie ERK/MAPK contrôle la différenciation des cellules caliciformes et donc, serait impliquée dans la protection de l'épithélium intestinal de l'inflammation. En effet, les souris invalidées pour *Shp-2* développent très rapidement et spontanément une inflammation sévère apparentée à une colite ulcéreuse (Coulombe et al., 2013). Ces souris présentent une baisse marquée du nombre de cellules caliciformes dans le côlon. Cette baisse, ainsi que l'inflammation observée chez ces souris, peuvent être prévenues grâce à l'expression concomitante des formes actives de KRAS (Yamashita et al., 2014), de BRAF (Gagné-Sansfaçon, en préparation) ou de MEK1 (Heuberger et al., 2014). Ainsi, les résultats impliquant la signalisation ERK1/2 dans ces souris suggèrent un rôle de cette voie dans la protection contre l'inflammation, possiblement attribuable à son rôle positif dans la différenciation des cellules caliciformes, entre autres.

Pris ensemble, ces résultats montrent autant un rôle pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire. Ceci doit dépendre en partie du type cellulaire dans lequel la voie est activée : dans les cellules immunitaires, l'activation des ERK semble stimuler l'inflammation alors que dans les cellules épithéliales intestinales, elle semble la prévenir. D'autres études sont évidemment nécessaires pour clarifier cette divergence de rôles.

4. Le cancer colorectal

Le nombre de nouveaux cas de cancer colorectal dans le monde en 2012 est estimé à 1,4 millions. C'est le troisième cancer le plus diagnostiqué chez l'homme et le deuxième chez la femme (Ferlay et al., 2015). Il existe trois types de cancer colorectaux : le cancer génétique, le cancer associé à la colite et le cancer sporadique (Arnold et al., 2005; Feagins et al., 2009). Le cancer colorectal génétique est dû à des altérations génétiques et est associé à des maladies génétiques comme la polypose adénomateuse familiale (FAP) ou le syndrome de Lynch aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). La FAP est causée par une mutation d'un allèle d'*APC* qui va occasionner l'apparition de multiples polypes dans le côlon (Grodén et al., 1991; Kinzler et al., 1991). Certains de ces polypes vont accumuler les mutations pour se développer en lésion maligne (Boland et al., 1995). Le syndrome de Lynch est plutôt causé par une mutation dans un gène associé à la réparation des mésappariements d'ADN, tels que *hMSH2* (*mutS protein homolog 2*) ou *hMLH1* (*mutL homolog 1*) (Lynch et de la Chapelle, 2003). Environ 5% des cancers colorectaux auraient une origine génétique (Marra et Boland, 1995). Le cancer associé à la colite est un cancer colorectal initié par l'inflammation intestinale chronique et incontrôlée, principalement par la colite ulcéreuse (Feagins et al., 2009). Finalement, la majorité des cancers colorectaux, soit 85 à 90%, sont d'origine sporadique (Kinzler & Vogelstein, 1996).

4.1 Le cancer sporadique

Le cancer sporadique découle d'une série de mutations séquentielles dans plusieurs gènes impliqués dans des processus cellulaires importants comme la stabilité du génome et la progression du cycle cellulaire (Mundade et al., 2014). Il existe trois principales voies de pathogénèse du cancer colorectal : la voie de l'instabilité des chromosomes (CIN), la voie de l'instabilité des microsatellites (MSI) et la voie néoplasique dentelée (Figure 5) (Pino et Chung, 2010).

Le gène *APC* est muté dans 60 à 80% des cancers colorectaux sporadiques carcinomes (Jass, 2002; Worthley et al., 2007). Cette mutation est responsable de l'initiation tumorale de la plupart des cancers colorectaux dont la carcinogénèse suit la voie d'instabilité des chromosomes. Deux

événements peuvent interférer avec la fonction normale d'*APC*, soit l'inactivation d'une des copies du gène *APC* ou la perte d'un des deux bras longs du chromosome 5 (Esteller et al., 2000; Powell et al., 1992). Tel que mentionné ci-haut, la protéine APC fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine. Ainsi, les mutations de la protéine APC affectent souvent sa liaison avec la β -caténine; celle-ci s'en trouve ainsi stabilisée et peut transloquer au noyau activer la transcription de ses gènes cibles, principalement impliqués dans la prolifération cellulaire (Mann et al., 1999). Selon le modèle élaboré par B. Vogelstein dans les années 90, l'inactivation du gène *APC* qui mène à la formation d'adénomes est suivie de la mutation gain de fonction dans un gène *RAS*, surtout *KRAS*. Les oncogènes *RAS* activent plusieurs voies de signalisation notamment la voie ERK/MAPK, bien connue pour son implication dans le contrôle du cycle cellulaire et de la croissance. 35-42% des cancers colorectaux présentent des mutations dans les gènes *KRAS* ou moins fréquemment *NRAS* (Pretlow & Pretlow, 2005; Worthley et al., 2010). La perte d'hétérozygotie du chromosome 18q contenant *SMAD4/2* (*mothers against decapentaplegic homolog 4/2*) impliqués dans la voie du TGF β , permettrait le développement d'un adénome tardif et avancé, de concert avec la mutation *RAS* (Mundade et al., 2014). Finalement, l'inactivation du gène *TP53*, impliqué dans le maintien de l'intégrité génome et dans le contrôle de la survie et du cycle cellulaire représente l'étape finale pour la formation d'un cancer colorectal invasif (Amaral et al., 2010; Fearon & Vogelstein, 1990).

La voie d'instabilité des microsatellites débute avec la mutation d'un gène de réparation des mésappariements d'ADN tels que *MLH1* ou *MSH2* (Armaghany et al., 2012). Le système de réparation des mésappariements corrige les erreurs occasionnées lors de la réplication de l'ADN lorsque ces erreurs sont des mésappariements de bases ou de courtes insertions ou délétions de bases. Des mutations dans les gènes de mésappariements vont occasionner des répétitions de paires de bases dans des séquences microsatellites codantes ou non dû au mauvais fonctionnement du système de réparation (Arnold et al., 2005). Une perte de fonction du suppresseur de tumeur *APC* constitue également un événement précoce dans la voie d'instabilité des microsatellites (Armaghany et al., 2012).

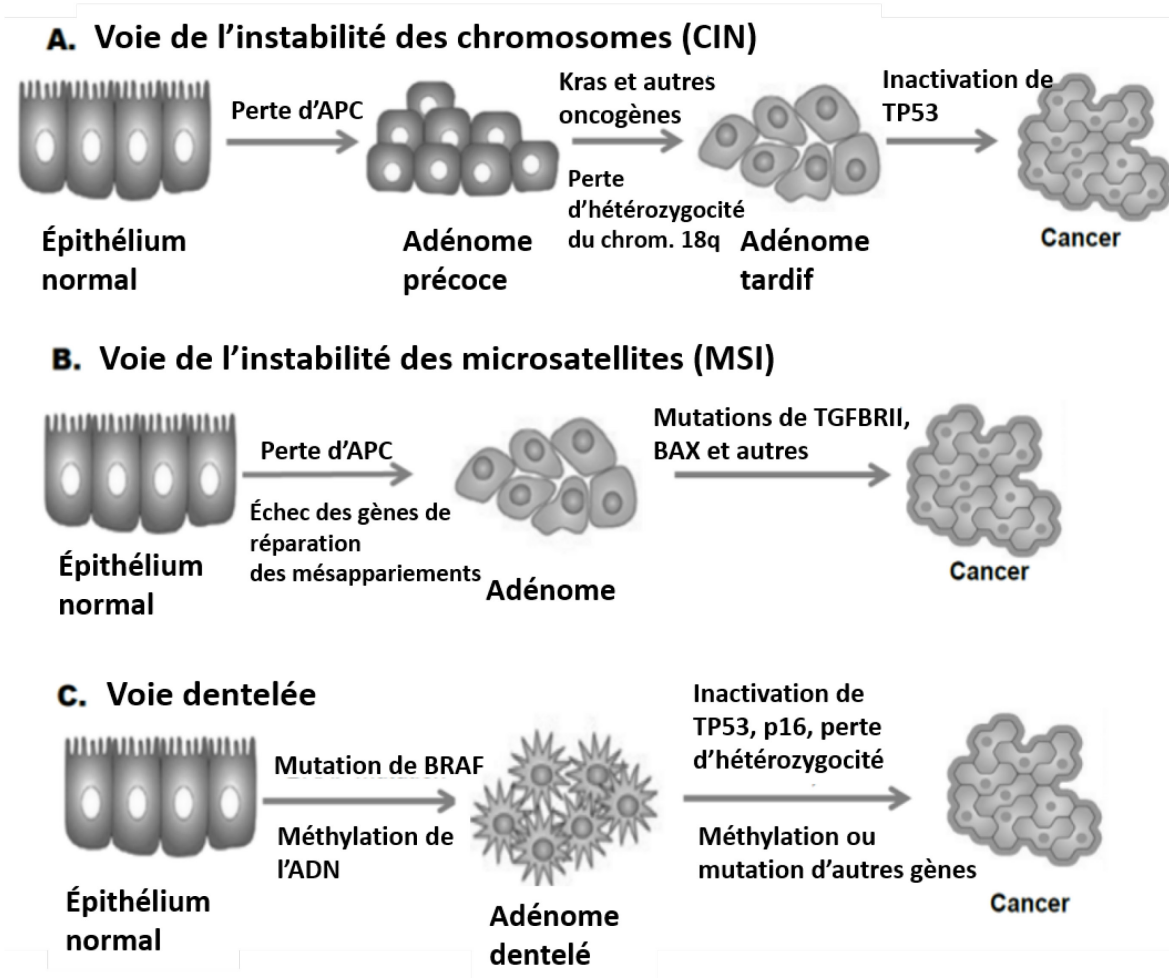


Figure 5 Séquences de mutations des diverses voies de pathogénèse du cancer colorectal

Il existe trois principales voies de carcinogénèse colorectale : la voie d'instabilité des chromosomes, la voie d'instabilité des microsatellites et la voie dentelée. La voie d'instabilité des chromosomes est la voie classique. Elle débute par une mutation au niveau du suppresseur de tumeur APC suivie d'une mutation au niveau de l'oncogène KRAS ou NRAS. Finalement, la perte d'hétérozygotie du chromosome 18q contenant SMAD2/4 et l'inactivation de p53 permettent l'avancement vers un stade plus invasif. La voie d'instabilité des microsatellites débute avec une mutation au niveau du gène *MSH2* ou *MLH1* tous deux impliqués dans la réparation des mésappariements d'ADN (MMR). Finalement, la voie néoplasique dentelée débute avec une mutation au niveau de l'oncogène BRAF et implique la méthylation de plusieurs gènes au niveau des îlots CpG. Figure tirée et modifiée de (Mundade et al., 2014).

Finalement, la voie néoplasique dentelée, pour *serrated pathway*, débute plutôt avec une mutation au niveau de l'oncogène *BRAF* (ou plus rarement *KRAS*), lui aussi impliqué dans la voie ERK/MAPK. Le nom de cette voie néoplasique est attribuable à l'histologie de la tumeur. En effet, les lésions cancéreuses ont une apparence dentelée très caractéristique à la mutation de *BRAF*. Contrairement aux deux autres voies de carcinogenèse, la mutation *APC* n'est pas l'élément déclencheur ici, mais c'est plutôt la mutation dans le gène *BRAF* qui est initiatrice. Aussi, l'activation en aval des kinases MEK/ERK serait responsable de l'initiation de la tumorigenèse par la voie dentelée (Leggett et Whitehall, 2010). Cette voie de carcinogenèse est également caractérisée par plusieurs modifications épigénétiques de l'ADN, principalement la méthylation de gènes impliqués dans la différenciation, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (Jass et al., 2002; Leggett & Whitehall, 2010). La méthylation de gènes a lieu sur les cytosines des îlots CpG qui sont des segments de l'ADN comportant seulement des cytosines et des guanines. Le principal résultat de la méthylation de l'ADN est la répression transcriptionnelle du gène codant souvent pour un suppresseur de tumeur (Robertson, 2005).

4.2 La voie ERK/MAPK dans le cancer colorectal

La voie de signalisation RAS/RAF/MAPK joue un rôle très important dans la carcinogenèse colorectale (Fang et Richardson, 2005). En effet, des mutations de type gain de fonction dans les gènes *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF* surviennent de façon assez précoce durant le processus de carcinogenèse. Les oncogènes *KRAS* et *NRAS* sont mutés dans plus de 40% des cancers colorectaux alors que *BRAF* est muté dans 9-11% des cancers colorectaux (Pretlow & Pretlow, 2005; Worthley et al., 2010) (Davies et al., 2002; Rajagopalan et al., 2002). De plus, les kinases à double spécificité MEK sont phosphorylées et activées dans 30-40% des adénomes et 76% des tumeurs colorectales (Eggstein et al., 1999; Sug et al., 2004). Finalement, la surexpression d'EGFR, un activateur en amont de la voie ERK/MAPK, a été rapportée dans 25 à 82% selon les études (Spano et al., 2005).

Plusieurs études ont démontré le potentiel tumorigénique des oncogènes *KRAS* et *BRAF* dans des cellules épithéliales d'origine intestinale. En effet, plusieurs groupes ont démontré qu'induire l'expression des formes mutantes de *KRAS* (Cagnol et Rivard, 2013; Nandan et al., 2008) ou de *BRAF* (Cagnol et Rivard, 2013; Ikenoue et al., 2004) permettait la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales normales en culture telles que les IEC6 (cellules cryptales intestinales de rat immortalisées). Plusieurs groupes ont également montré que l'expression d'un MEK1 ou d'un MEK2 constitutif actif induisait une transformation oncogénique associée à une transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules épithéliales intestinales normales (Komatsu et al., 2005;

Lemieux et al., 2009; Voisin et al., 2008). Il a d'ailleurs été démontré que des IEC6 surexprimant un MEK1 constitutif actif développaient la capacité de croître en indépendance d'ancrage, de former des tumeurs invasives dans des xénogreffes chez les souris nues et de former des métastases aux poumons chez les souris nues (Boucher et al., 2004; Lemieux et al., 2009).

Pour étudier le rôle des oncogènes *RAS* et *BRAF* dans la tumorigenèse intestinale *in vivo*, plusieurs groupes ont effectué des expériences sur des souris exprimant des formes oncogéniques de *RAS* et *BRAF*. Dans des modèles de souris exprimant un *KRAS*^{G12D} seulement dans l'épithélium intestinal, une expansion du compartiment prolifératif (Haigis et al., 2008) et une augmentation de la prolifération des cellules souches Lgr5+ (Snippert et al., 2014) et des cellules souches quiescentes (Gierut et al., 2015) ont été démontrées. Ces souris développent après 1 à 2 mois de l'hyperplasie dans 90 % des cryptes du côlon (Feng et al., 2011), mais ne développent pas de lésions malignes (Trobridge et al., 2009). Les souris exprimant un *BRAF*^{V637E}, l'homologue du *BRAF*^{V600E} chez l'humain, développent également une hyperplasie assez rapidement. Dès 2 à 3 mois, des lésions dysplasiques sont observables et à 10 mois, toutes les souris possèdent des lésions dysplasiques caractéristiques d'adénomes dentelés et ressemblants au phénotype observé chez les patients présentant un adénome dentelé dû à une mutation *BRAF*. Chez certaines souris, ces lésions dysplasiques ont évolué en carcinome invasif (Rad et al., 2013).

Tous ces résultats démontrent l'importance des effecteurs de la voie RAS/BRAF/MEK dans la transformation épithéliale intestinale et dans l'acquisition d'un potentiel tumoral, voire invasif. Conséquemment, ces résultats suggèrent fortement un rôle important pour les kinases en aval ERK1/2 dans la tumorigenèse. Cependant, Yeh et al. ont analysé les niveaux de phosphorylation des ERK1/2 dans 190 tumeurs colorectales paires de patients. Les niveaux d'activation des ERK1/2 étaient significativement moins élevés dans les tumeurs comparées au tissu sain et ce, dans le noyau comme dans le cytoplasme (Yeh et al., 2009). Notre groupe a aussi récemment vérifié le niveau de phosphorylation de ces kinases dans une banque de tumeurs colorectales paires à différents stades. Nos analyses montrent également que les ERK sont moins phosphorylées dans la plupart des tumeurs en comparaison à la marge saine et ce, tous stades confondus (Cagnol S., résultats non publiés). Ces résultats suggèrent donc que les kinases ERK1/2 sont inhibées au cours de la carcinogenèse colorectale.

Afin de mieux comprendre la régulation spatiotemporelle de l'activité ERK, notre groupe a généré un plasmide permettant l'expression de l'oncogène *BRAF*^{V600E} de manière inductible au tamoxifène dans les cellules épithéliales intestinales IEC6 (Cagnol et al. 2013). Suite à l'ajout de tamoxifène, une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 est observée autant dans le cytoplasme que dans

le noyau. Cependant après 1,5h, la présence des ERK1/2 phosphorylées dans le noyau diminue considérablement pour finalement disparaître après 3h. Ainsi, l'activation d'un BRAF oncogénique n'est pas suffisante pour induire une activation soutenue des ERK1/2 au noyau. De manière intéressante, un court traitement des cellules au pervanadate, un inhibiteur des tyrosines phosphatases et des DUSPs (Dual-Specificity Phosphatases) permet de restaurer la présence de l'activité ERK au noyau lors d'une stimulation oncogénique de BRAF. Ces résultats suggèrent donc l'implication de phosphatases dans l'inhibition nucléaire de l'activité ERK. En analysant l'expression de différentes DUSPs, notre équipe a observé que l'expression de la phosphatase DUSP4, une phosphatase nucléaire capable de déphosphoryler ERK1/2 (Owens et Keyse, 2007), était fortement induite suite à l'activation oncogénique de BRAF^{V600E} suggérant ainsi la mise en place d'un rétrocontrôle négatif (Cagnol et Rivard, 2013).

Ces résultats suggèrent ainsi que les DUSPs sont probablement mobilisées durant la carcinogenèse colorectale pour régulariser l'activité ERK.

5. Les DUSPs (Dual-Specificity Phosphatases)

Les DUSPs pour *Dual-Specificity Phosphatases* sont des phosphatases capables de déphosphoryler un résidu tyrosine et thréonine en motif TXY présents chez les MAPK (ERK1/2, JNK et p38 α , β , γ , δ) (Camps et al., 2000; Keyse, 2000; Theodosiou & Ashworth, 2002). Elles sont également appelées MKP pour MAPK phosphatases. Il existe trois classes dans lesquelles sont regroupées les dix différentes DUSPs. La première classe est la classe des DUSPs nucléaires et inductibles. Elle regroupe DUSP1/MKP-1, DUSP2, DUSP4/MKP-2 et DUSP5. La deuxième classe contient les DUSPs cytoplasmiques spécifiques à ERK1/2, soit DUSP6/MKP-3, DUSP7 ET DUSP9/MKP-4. Finalement, la dernière classe contient les DUSPs qui déphosphorylent préférentiellement les JNK et p38. Ces phosphatases ont en commun un domaine N-terminal non-catalytique et un domaine C-terminal catalytique. Le domaine N-terminal contient un motif KIM (*kinase interaction motif*) responsable de la reconnaissance des différentes MAPK. Il contient également un NLS (*nuclear localisation signal*) ou un NES (*nuclear export signal*) qui détermine la localisation nucléaire ou cytoplasmique. Il y a une grande homologie de séquence entre les domaines C-terminaux catalytiques des différentes DUSPs (Owens et Keyse, 2007). Ils possèdent tous une cystéine essentielle à la déphosphorylation du résidu phosphorylé (Denu et Dixon, 1998). Il a été démontré que les DUSPs sont capables de se lier aux MAPK non-phosphorylées ce qui a soulevé l'hypothèse d'un rôle des DUSPs dans la séquestration des MAPK pour contrôler leur localisation (Caunt et Keyse, 2013).

5.1 La régulation de *DUSP6*

La phosphatase *DUSP6* fait partie de la classe de DUSPs cytoplasmiques spécifiques à ERK1/2. *DUSP6* possède donc un NES qui permet sa localisation cytoplasmique (Kidger et Keyse, 2016). Il a été démontré que la liaison de *DUSP6* à ERK2 grâce à son domaine non catalytique permettait une augmentation de son activité phosphatasique, suggérant ainsi un mécanisme pour augmenter la spécificité de *DUSP6* envers ERK1/2 (Camps et al., 1998; Muda et al., 1998). L'expression de *DUSP6* est aussi régulée de façon post-traductionnelle en réponse à une stimulation au sérum ou par des facteurs de croissance. En effet, *DUSP6* peut être phosphorylée sur les sérines 159 et 197 de façon MEK- ou mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-dépendante (Bermudez et al., 2008; Marchetti et al., 2005). Ces phosphorylations ciblent *DUSP6* à la dégradation dans le protéasome (Marchetti et al., 2005). Le domaine N-terminal et le domaine C-terminal de *DUSP6* peuvent aussi interagir ensemble induisant un mécanisme d'auto-inhibition. De plus, *DUSP6* peut s'oligomériser, mais la liaison ERK/*DUSP6* est favorisée par rapport à la liaison des deux domaines de *DUSP6* (Mark et al., 2008).

Plusieurs études suggèrent que *DUSP6* agit comme un rétrocontrôle négatif pour le niveau d'activation des kinases ERK1/2. En effet, son expression est induite au niveau transcriptionnel suite à l'activation de ces kinases (Ekerot et al., 2008; Zhang et al., 2010). *DUSP6* fait d'ailleurs partie des gènes qui sont les plus induits en réponse à l'activation des ERK1/2 dans des cellules cancéreuses possédant une mutation *RAS* ou *RAF*, participant ainsi au contrôle de l'activité ERK (Haigis et al., 2008; Packer et al., 2009; Vartanian et al., 2013).

5.2 Les processus cellulaires régulés par *DUSP6*

Un groupe de recherche s'est notamment intéressé à l'implication de *DUSP6* dans les dommages à l'ADN. Lors de traitements à différents agents cytotoxiques, ils ont remarqué que les cellules A431, des cellules d'adénocarcinome cervical, sous-exprimant *DUSP6* par shARN étaient plus sensibles à ces traitements. Ils ont donc comparé la phosphorylation de différentes protéines impliquées dans les dommages à l'ADN suite à la sous-expression de *DUSP6*. De façon intéressante, ils ont observé une augmentation de la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN notamment des protéines impliquées dans la voie de signalisation ATM/CHK2 impliquée dans la réparation par excision de base. Cette augmentation d'activité de la voie ATM/CHK2 corrèle avec une augmentation du nombre de cellules démontrant des bris double-brin d'ADN par essai TUNEL (Bagnyukova et al., 2013). Ces résultats suggèrent que *DUSP6* protégerait les cellules contre des dommages cytotoxiques tels que des dommages à l'ADN. De plus, le gène *DUSP6* est une cible

transcriptionnelle de p53, bien connu pour son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN. La baisse d'expression de DUSP6 dans des cellules cancéreuses colorectales HCT116 mène à une modulation des niveaux de certaines protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) impliquées dans la régulation de l'apoptose et ce, de façon p53-dépendante (Piya et al., 2012).

Finalement, les souris invalidées pour *Dusp6* présentent différents phénotypes tissus-spécifiques. En effet, ces souris présentent une hyperprolifération des myocytes cardiaques, ce qui semble les protéger contre une surcharge de pression à long terme (Maillet et al., 2008). Ces souris sont aussi résistantes à l'obésité induite par une diète élevée en gras. En effet, les souris invalidées pour *Dusp6* démontrent un niveau de glucose sanguin significativement plus bas que les souris contrôles et possèdent aussi une plus grande sensibilité à l'insuline (Feng et al., 2014). Un autre groupe a tenté d'évaluer le mécanisme expliquant cette résistance à une l'obésité induite par une diète élevée en gras. Comme il est bien connu que le microbiome intestinal a une grande influence sur l'obésité (Everard et al., 2014; Tilg & Kaser, 2011; Walters et al., 2014), Ruan et al. (2016) ont analysé le microbiome des souris invalidées pour *Dusp6*. Tel qu'attendu, ils ont mis en évidence que le microbiome intestinal des souris invalidées pour *Dusp6* était grandement modifié. En effet, ils ont remarqué une abondance de *Firmicutes* et de *Deferribacteres* et une diminution des *Bacteroidetes*, des *Actinobactéries* et des *Proteobactéries* par rapport aux souris contrôles. Ils ont également démontré que cette modification dans le microbiome permettait une certaine résistance à l'obésité induite par une diète haute en lipides, et ce, grâce à une transplantation fécale dans des souris élevées dans un milieu sans germes. Ces souris développent une obésité moins élevée que les souris ayant eu une transplantation fécale de souris contrôles. De plus, Ruan et al. ont observé des changements significatifs dans le transcriptome intestinal. En effet, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme et l'adhésion cellulaire étaient régulés à la hausse chez les souris invalidées pour *Dusp6*. Ils ont notamment observé une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans les jonctions serrées. Pour valider si cela pouvait être corrélé avec une diminution de la perméabilité intestinale, ils ont gavé les souris au FITC-Dextran et ont démontré une diminution de la perméabilité intestinale (Ruan et al., 2016).

5.3 DUSP6 dans le cancer

Tel que mentionné ci-haut, DUSP6 est une phosphatase spécifique à ERK1/2 et donc, exerce un contrôle négatif sur cette voie de signalisation. Étant donné l'implication de la voie ERK/MAP kinase dans la biologie de nombreux cancers, DUSP6 a initialement été soupçonnée d'être un suppresseur de tumeur.

DUSP6 a été étudiée particulièrement dans le contexte du cancer pancréatique, où le gène *KRAS* est muté dans plus de 90% des cas (Biankin et al., 2012). Dans ce contexte, il a été démontré que l'expression de DUSP6 est diminuée dans des tumeurs pancréatiques de stades avancés (Furukawa et al., 2003). En fait, une région de l'intron 1 de *DUSP6* est hautement méthylée dans certaines lignées cancéreuses pancréatiques. Cette méthylation corrèle avec une baisse d'expression de la protéine suggérant ainsi la méthylation comme possible mécanisme expliquant la baisse d'expression de DUSP6 durant la progression de ce cancer (Xu et al., 2005). Ces résultats suggèrent ainsi un rôle potentiel de suppresseur de tumeur pour DUSP6.

DUSP6 a également été étudiée dans le cancer du nasopharynx. Il a été mis en évidence que dans des lignées cellulaires de cancer du nasopharynx, la surexpression de DUSP6 permet une diminution de leur croissance en indépendance d'ancrage et de leur potentiel tumoral chez des souris immunodéficientes. Plus spécifiquement, la surexpression de DUSP6 atténue le phénotype épithélio-mésenchymateux de ces cellules (Wong et al., 2012).

Au contraire, dans les tumeurs du sein résistantes au tamoxifène, une augmentation du niveau d'expression des transcrits de DUSP6 est plutôt observée. Cette augmentation serait d'ailleurs un marqueur de la résistance de certains cancers du sein au tamoxifène (Cui et al., 2006).

Hypothèse et objectifs

Depuis plusieurs années, notre groupe étudie le rôle de la signalisation KRAS/BRAF/MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales (Aliaga et al., 1999) (Boucher et al., 2004; Lemieux et al., 2009, Cagnol & Rivard, 2013) . Nos travaux ont démontré que cette signalisation était cruciale pour leur prolifération, leur différenciation et leur transformation néoplasique. Nous avons également observé que le niveau de phosphorylation des ERK1/2 était fortement modulé durant ces processus par exemple lors de la différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999) et lors de la transformation oncogénique (Cagnol et al., 2013). Par contre, les mécanismes de régulation de la phosphorylation et de l'activité ERK1/2 dans les cellules de l'épithélium intestinal n'ont jamais été vraiment étudiés.

DUSP6 est la principale phosphatase cytoplasmique spécifique capable de déphosphoryler les kinases ERK1/2 (Kidger et Keyse, 2016). Nous avons déjà observé que l'expression de cette phosphatase était augmentée lors la différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999) et lors de la transformation induite par l'oncogène BRAF (S. Cagnol, résultats non publiés). Suivant cette augmentation de l'expression de DUSP6 dans la transformation oncogénique, l'hypothèse de la présente recherche était donc qu'***en modulant directement et spécifiquement l'activité ERK1/2, DUSP6 contribue au maintien de l'homéostasie intestinale et au développement du cancer colorectal.***

Pour répondre à cette hypothèse, deux objectifs ont été fixés :

Le premier était d'analyser les rôles physiologiques de DUSP6 dans le maintien de l'homéostasie intestinale en utilisant un modèle murin invalidé pour *Dusp6*. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à son implication dans la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que son implication dans la réponse à un stress inflammatoire.

Le deuxième était de déterminer si DUSP6 participait à la carcinogenèse colorectale. Nous nous sommes intéressés à son rôle dans un modèle murin d'initiation tumorale induite par l'inactivation d'*Apc* et dans des cellules cancéreuses colorectales humaines en culture.

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Anticorps

L'anticorps contre DUSP6 (ab76310) provient de Abcam (Abcam, Cambridge, UK). L'anticorps contre l'actine (MAB1501R) a été acheté de Millipore (Millipore, Billerica, MA, É-U). Les anticorps contre ERK2 (sc-154) et sucrase-isomaltase (sc-27603) proviennent de Santa Cruz (Santa Cruz, Dallas, TX, É-U). L'anticorps contre les ERK1/2 phosphorylées (M8159) provient de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U). L'anticorps contre la β -caténine (610154) a été acheté chez BD Biosciences (BD Biosciences, San Jose, CA, É-U). L'anticorps contre la chromogranine A (20085) a été acheté chez Immunostar (Immunostar, New Richmond, WI, É-U). L'anticorps contre le lysozyme (A0099) provient de Agilent Technologies (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, É-U). L'anticorps contre Ki67 (GTX16667) a été obtenu chez Genetex (Irvine, CA, É-U).

2. Méthodes

2.1 Souris

Les souris ont été fournies par le laboratoire de Jeffrey Molkentin (Cincinnati, Ohio, USA). Les trois exons du gène *Dusp6* ont été remplacés par une cassette néomycine dans des cellules souches embryonnaires de souris SV129j. Les souris chimériques (SV129j et C57Bl/6) ont été croisées avec une souris C57Bl/6 pour obtenir une souris hétérozygote avec origine mixte. Les croisements ont été effectués avec deux souris hétérozygotes. Les souris C57BL6/J-*Apc*^{Min/+} ont été obtenues du laboratoire Jackson (Bar Harbor, ME, USA). Une souris *Dusp6*^{+/-} a été croisée avec une souris *Apc*^{Min/+} pour obtenir une souris *Dusp6*^{+/-};*Apc*^{Min/+}. Cette souris a par la suite été croisée avec une souris *Dusp6*^{+/-} pour obtenir des souris *Dusp6*^{+/+};*Apc*^{Min/+} et *Dusp6*^{-/-};*Apc*^{Min/+}.

Les croisements et expériences de souris sont effectués conformément aux normes du CCPA (Conseil Canadien de Protection des Animaux) et du comité éthique de protection des animaux de la Faculté de médecine et des sciences de la santé (FMSS) de l'Université de Sherbrooke. À 12 sem, les souris sont injectées de façon intrapéritonéale avec de la kétamine/xylazine (87 mg de kétamine/13 mg de xylazine par kg), puis sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les tissus sont prélevés sur glace pour éviter la dégradation et sont resuspendus dans le tampon de lyse adéquat. Le prélèvement est un enrichissement de muqueuse grattée avec une lamelle pour prélever principalement de l'épithélium.

Par la suite, les tissus sont mis dans l'azote liquide et entreposés à -80°C. Les tissus pour coupes histologiques sont fixés dans différents fixateurs et à différentes températures selon la coloration (voir les détails plus loin). Les polypes de souris *Apc*^{Min/+} ont été visualisés au binoculaire (M5-48288, Wild, Heerbrugg, Suisse) grâce au bleu de méthylène et ont été dénombrés et leur taille mesurée.

2.2 Traitement DSS, score histologique et index de maladie

Pour le traitement au DSS, le DSS 2% a été mis dans l'eau de boisson des souris pendant 7 jours. L'eau de boisson a été changée au jour 3 et les souris ont été euthanasiées au jour 7. Le poids des souris a été mesuré tous les jours du traitement au DSS. Des échantillons totaux du côlon proximal et distal ont été recueillis pour des extraits totaux protéiques et d'ARN. L'index de la maladie a été mesuré selon la consistance des fèces (0 à 4), les saignements rectaux (0 à 4), la dureté du côlon (0 à 4) et le sang dans les fèces (0 à 4). Le score histologique a été basé sur la présence d'abcès de cryptes (0 à 1), l'épaississement de la musculature (0 à 3), la perte de cellules caliciformes (0 à 1), l'infiltration des cellules immunitaires (0 à 1) et l'érosion de l'épithélium (0 to 3) et été faits à l'aveugle.

2.3 Géotypage des souris

Les souris sont géotypées avec un morceau d'orteil prélevé entre les jours 4 et 10 après la naissance et qui a été digéré 90 µL d'une solution de NaOH 2,5 mM/ EDTA 0,2 mM pendant 1h à 95°C. La réaction est arrêtée avec 90 µL de Tris-HCl 40 mM pH 5,5. Le PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) est effectué sur l'appareil BioRad S1000 Thermal Cycler (voir tableau 1 pour les amorces et tableau 2 pour les programmes PCR). Le produit PCR est migré sur gel d'agarose 1% pendant 20 min à 110V (Fisher Biotech FB105, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É-U). Les bandes sont révélées à la lampe UV (MBI Lab Equipment, Dorval, QC, Canada) grâce à du RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 0,005% v/v mis dans le gel d'agarose (21141, FroggaBio, Toronto, ON, Canada).

Tableau 1 Liste des amorces de géotypage

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
1. DUSP6 Néomycine-Knockout	GCT CTA TGG CTT CTG AGG CG
2. DUSP6 Exon 1-WT	CAG TCC ATC AGC AGC AGC TGT TCG
3. DUSP6-3 Amorce inverse commune	CAT TGA CTC GGA GAG TGA TCT GGT
APC Min 033	GCC ATC CCT TCA CGT TAG
APC Min 034	TTC CAC TTT GGC ATA AGG C
APC Min 758	TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA

Tableau 2 Aperçu des programmes PCR utilisés

Dusp6		APC^{Min/+}	
94°C	2 min	94°C	3 min
94°C	25 s	94°C	1 min
56°C	30 s	55°C	1 min
72°C	1 min	65°C	1 min
Répéter les 3 dernières étapes 35 X		Répéter les 3 dernières étapes 35 X	
72°C	10 min	65°C	2 min

Recette PCR**Dusp6**

0,6 µL amorce 1
 1 µL amorces 2 et 3
 2,2 µL tampon maison
 0,5 µL dNTPs 25Mm
 16,7 µL d'eau stérile
 1 µL Taq maison

0.8 µL ADN

APC^{Min/+}

1 µL de chaque amorce
 2,2 µL de tampon maison
 0,5 µL dNTPs 10 mM
 15,4 µL d'eau stérile
 1 µL Taq maison

1 µL ADN

2.4 Banque de tumeurs colorectales humaines

Les tissus de 63 tumeurs colorectales, ainsi que leur marge saine située à au moins 10 cm de la tumeur du même patient ou de la même patiente ont été récoltés (Biobanque du Dr J. Carrier, Université de Sherbrooke). Ces tissus ont été congelés dans de l'azote liquide dans les 15 min suivant la résection de la tumeur et du tissu sain et ont été conservés dans l'azote liquide jusqu'à extraction. Les patient(es) n'ont pas reçu de thérapie néoadjuvante. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique à la recherche du Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke. Le prélèvement a été effectué après un consentement écrit éclairé de la personne. L'extraction d'ARN a été effectuée avec le kit Totally RNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.U.) selon le protocole du manufacturier. Les tumeurs ont été classées de façon histologique selon les critères TNM (tumeur, nodule lymphatique et statut métastatique) de stade.

2.5 Extraction protéique des échantillons de souris

Les enrichissements de muqueuse sont resuspendus dans du tampon RIPA. Ce tampon est composé de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, de NaCl 150 mM, d'EDTA 0,5 mM, de NP40 1%, de NaDeoxycholate 0,5%, de SDS 0,1%, de DTT 1 mM, de β -glycérophosphate 40 mM, d'orthovanadate 100 μ M (inhibiteur de phosphatases) et de PMSF, leupeptine, aprotinine et pepstatine à 1mM. En les sortant du -80°C, les échantillons sont gardés sur glace pour éviter la dégradation. Le tissu est broyé avec des billes de métal avec l'aide d'un appareil (69980, TissueLyserLT, Qiagen, Hilden, Allemagne) qui effectue 50 oscillations par seconde pendant 3 min. Par la suite, l'échantillon est agité doucement pendant 10 minutes. Finalement, l'échantillon est centrifugé à 10 000 rpm (Micromax, Thermo Fisher Scientific) à 4°C pendant 10 min pour enlever les débris. Le surnageant est récolté et stocké à -80°C.

2.6 Extraction d'ARN d'échantillons de souris

Les enrichissements de muqueuse sont resuspendus dans du tampon RLT (74106, RNeasy Kit, Qiagen) contenant 1% β -mercaptoéthanol. Le tissu est homogénéisé avec des billes de métal et est mis dans un appareil (69980, TissueLyserLT, Qiagen) qui effectue 50 oscillations par sec pendant 3 min. Par la suite, le tissu homogénéisé est centrifugé à 10 000 rpm (ThermoScientific IEC, Micromax) à 4°C pendant 10 min pour enlever les débris. L'ARN est purifié avec le kit RNeasy de Qiagen selon le protocole du manufacturier. L'extrait a été traité avec la DNase de Qiagen sur colonne (79254, RNase Free DNase set, Qiagen) conformément au protocole du manufacturier. L'extrait d'ARN est dosé au Nanodrop2000c (Thermo Fisher Scientific). Les ARN sont dénaturés 10 min à 75°C dans une solution de dépôt d'ARN (53% glycérol, 40% formaldéhyde, 0,01% bleu de bromophénol et 0,01% de xylène Cyanol), puis déposés sur gel d'agarose 2% pour vérifier la qualité de l'ARN. Le gel est migré pendant 20 min à 110 V.

2.7 Essais RT-PCR et PCR quantitatif

La RT-PCR est effectuée avec 5 U de la transcriptase inverse de Roche (03 531 287 001, Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Laval, QC, Canada) par réaction. De plus, l'inhibiteur de RNase de Roche (03 335 399 001, Protector RNase Inhibitor, Roche) est utilisé à 10 U par réaction. La réaction est effectuée dans 10 μ L final. Le tampon 5X de la transcriptase inverse de Roche est utilisé ainsi que des dNTPs 1mM final et des amorces aléatoires 0,04 A₂₆₀ unités au final (11 034 731 001, Primer random, Roche). 1 μ g d'ARN dans 5 μ L d'eau est incubé à 75 °C pendant 10 min puis le mélange de réaction (5 μ L) est ajouté à l'ARN. La réaction s'effectue pendant 10 min à 25°C, puis pendant 30 min à 55°C et finalement pendant 5 min à 85°C. Les ADN complémentaires sont analysés par la plateforme d'analyse du transcriptome (RNomique) de la FMSS de l'Université de Sherbrooke à une

concentration de 3,33 ng/ μ L. Les gènes de référence utilisés sont les gènes *Pum1*, *Psmc4* et *Tbp*. Les amorces utilisées sont énumérées dans le tableau 3.

La plaque d'échantillons de tissus de personnes atteintes de maladies inflammatoires a été obtenue chez OriGene (Crohn's/Colitis cDNA Array II CCRT102). Les échantillons ont été resuspendus dans 10 μ L d'eau sans RNase et 1 μ L a été utilisé par réaction de PCR quantitatif. Le gène de référence utilisé est *PUM1*. Le gène *DUSP6* a été mesuré comme gène d'intérêt. Les amorces utilisées sont énumérées dans le tableau 3.

Tableau 3 Liste des amorces utilisées pour les analyses par PCR quantitatif

Gène	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce anti-sens
<i>Psmc4</i>	CCCAGGAGGAGGTGAAGCGG	GGTCGATGGTACTCAGGATGCG
<i>Pum1</i>	TGCCAGTCTCTTCCAGCAGCA	TGATTTGGGGTCAAAGGACGTTGG
<i>Tbp</i>	GCCTTCCACCTTATGCTCAGGG	TGCTCTTCCAAAATAGAGAGACTGTTGG
<i>Sis</i>	AGTCCAACCTTCAACCCCTAGTCCT	GCAACAGCCACGCTCTTCACAT
<i>Lyz1</i>	GGAATGGAATGGATGGCTACCGT	TCCCATAGTCGGTGCTTCGGTC
<i>Defa</i>	TGAGGAGCAGCCAGGGGAAGA	GCGTTCTCTTCTTTTGCAGCCTCTT
<i>Sox9</i>	GACTCCCCACATTCTCCTCCG	CGCCCCTCTCGCTTCAGATCAA
<i>Ascl2</i>	GCTACTGAGCATCCCACCCCC	AGTCAGCACTTGGCATTGTTGTC
<i>Lgr5</i>	GTGAGCTGGATGGCAGGATGC	AGGCGATGTAGGAGACTGGCG
<i>Slc26a3</i>	TCAACATCCCTCCAGCCTACGG	ACCACTCTTGTAACGACAACCTCCCA
<i>PUM1</i>	TGAGGTGTGCACCATGAAC	CAGAATGTGCTTGCCATAGG
<i>DUSP6</i>	TGCCGAATCTCTTTGAGAACGCA	GACACCACAGTTCTTGCCCCG
<i>Axin2</i>	CACCCTTCGCCAACCCAAGC	TGAGCCTTCAGCATCCTCCTGT

2.8 Immunobuvardage

Les protéines sont dosées à l'acide bicinchoninique et CuSO_4 selon la méthode décrite par (Smith et al., 1985). Les protéines sont resuspendues dans du Laemmli (bleu de bromophénol 1% et β -mercaptoéthanol 1%). Elles sont migrées sur un gel SDS-Page 10% acrylamide pendant 1h10 à 150 V. Elles sont ensuite transférées sur membrane de PVDF à 110 mA pendant 16h ou à 400 mA pendant 4h. La membrane est colorée au rouge Ponceau (0,2-0,8g/100mL de TCA 3%) (P3504, Sigma-Aldrich) pour visualiser les protéines. La membrane est réhydratée dans du méthanol et bloquée avec du lait en poudre 5% PBS Tween 0,05%. Les anticorps primaires sont incubés avec la membrane dans le lait en poudre 5% PBS Tween 0.05% à 4°C sur la nuit. Les membranes sont ensuite rincées

au PBS Tween 0,05% 3 fois pendant 10 min. L'anticorps secondaire est incubé avec la membrane dans du lait en poudre 5% PBS Tween 0,05% à température pièce pendant 1h. Les membranes sont rincées 2 fois pendant 10 min au PBS Tween 0.05% et 1 fois pendant 10 min au PBS. Les membranes incubées avec un anticorps secondaire couplé au HRP sont révélées grâce à la chimiluminescence avec une solution d'ECL maison (90 mM d'acide coumarique (C9008, Sigma-Aldrich), 250 mM de luminol (A8511, Sigma-Aldrich), 0,03% peroxyde d'hydrogène (7722-84-1, Sigma-Aldrich), Tris pH 8,5). Les membranes incubées avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline sont révélées avec une solution Tropix® CDP-Star® (T2305, ThermoFisher Scientific) 1/200 dans du tampon 100mM Tris, 100 mM HCl pH 9,5. La lumière émise est captée sur film autoradiographique (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

2.9 Circulation et inclusion des tissus

Les tissus sont fixés au paraformaldéhyde (PFA, P6148, Sigma-Aldrich) à 4% dans du PBS sur la nuit. Les tissus sont ensuite rincés 3 fois à l'éthanol 70%. La plateforme d'histologie et de microscopie de la FMSS de l'Université de Sherbrooke circule les tissus et les inclus dans la paraffine. La technicienne de la plateforme coupe ensuite les blocs de paraffine à 5 µm d'épaisseur et les dépose sur des lames Probe-On Plus (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, É.U.). Pour garder intacte la couche de mucus, les tissus sont fixés au Carnoy (60% éthanol, 30% chloroforme et 10% acide acétique glacial) pendant 4h. Les tissus sont ensuite rincés à l'éthanol 100%. La circulation et l'inclusion en paraffine se font en absence d'eau par la plateforme d'histologie. Les tissus sont coupés de la même façon que pour la fixation à la paraffine.

2.10 Coloration à l'Alcian Bleu

Les lames sont déparaffinées en chauffant à 60°C pendant 15 min et en trempant les lames dans des bains successifs : 5 min dans le xylène 2 fois, 2 min dans l'éthanol 100% 2 fois, 1 min dans l'éthanol 95% 2 fois, 1 min dans l'éthanol 80%, 1 min dans l'éthanol 70% et 1 min dans l'eau. Les lames sont fixées à l'acide acétique 3% pendant 3 min. Les lames sont ensuite colorées pendant 30 min à l'Alcian bleu 2% dans l'acide acétique 3 %. Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 10 min, puis elles sont contre-colorées au Nuclear Fast Red 0,1% filtré pendant 40 sec. Les lames sont rincées à l'eau courante pendant 1 min. Les lames sont ensuite déshydratées en trempant 2 min dans un bain d'éthanol 70%, 2 min dans un bain d'éthanol 80%, 2 min dans l'éthanol 95 % 2 fois, 2 min dans l'éthanol 100% et 2 fois 2 min dans le xylène. Les lames sont ensuite montées avec le milieu de montage Permount (SP15-100, Fisher Scientific) et des lamelles (48393 106, VWR, Radnor, PA).

É.U.). Les photos sont prises au Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, É.-U.).

2.11 Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E)

Les tissus ont été déparaffinés et réhydratés comme dans la section 2.10. Les lames sont ensuite immergées 3 min dans l'hématoxyline (Dako, Santa Clara, CA, É.U.). Les lames sont rincées à l'eau courante pendant 5 min. Elles sont par la suite immergées dans l'alcool acide 1% pour 30 sec et rincées à l'eau courante pendant 1 min. Finalement, les lames sont contre-colorées pendant 1 min 30 sec avec de l'éosine (Fluka, Sigma-Aldrich). Les lames sont déshydratées et montées tel que décrit dans la section 2.10.

2.12 Immunohistochimie

Les lames sont déparaffinées et réhydratées tel que décrit dans la section 2.10. Les antigènes sont révélés en bouillant les lames dans un tampon 10 mM d'acide citrique monohydrate pendant 6 min. Les lames sont refroidies ensuite pendant 10 min avant d'être rincées à l'eau courante pendant 10 min. Les lames sont lavées une fois dans le PBS pendant 5 min. Les tissus sont ensuite bloqués au PBS-BSA 2% NaAzide 0,05% pendant 30 min à température pièce. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dans du PBS-BSA 2% NaAzide 0,05% sur la nuit à 4°C. Les lames sont rincées au PBS 3 fois pendant 5 min. Les lames sont ensuite incubées pendant 5 min avec du Peroxidase Block (Dako). Après un rinçage de 5 min au PBS, les lames sont incubées avec l'anti-rabbit labbeled polymer HRP (Dako) pendant 1h à température pièce. Les lames sont ensuite rincées au PBS 3 fois pendant 5 min. Les lames sont finalement révélées au DAB (1 goutte de DAB chromogen pour 1mL de DAB substrate buffer). La réaction est arrêtée avec de l'eau déionisée. La contre-coloration est effectuée avec de l'hématoxyline de Harris pendant 5 sec. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 2 min. Elles sont ensuite immergées dans de l'alcool acide pendant environ 30 sec et rincées à l'eau courante pendant 2 min. Finalement, elles sont immergées dans de l'eau ammoniacale pendant environ 30 sec et rincées à l'eau courante pendant 5 min. Les lames sont ensuite déshydratées et montées tel que décrit dans la section 2.10. Les photos sont prises au Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, É.-U.) de la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke.

2.13 Immunofluorescence

Les lames sont déparaffinées, réhydratées tel que décrit dans la section 2.10. Les antigènes sont révélés tel que décrit dans la section 2.12. Le blocage et l'incubation de l'anticorps primaire se font également tel que décrit dans la section 2.12. Une fois les lavages dans le PBS effectués, l'incubation

de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 1/400 dans le PBS-BSA 2% NaAzide 0,05% se fait pendant 1h à température pièce dans une chambre humide à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite lavées dans le PBS 3 fois pendant 5 min dans un bac à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite incubées dans l'Evan Bleu (0,1g/100 mL de PBS) (23860, Matheson Coleman & Bell) pendant 1 min. Les lames sont ensuite rincées au PBS 3 fois 5 min et trempées dans l'eau déionisée. Les lames sont montées avec l'Immu-mount (9990402, Fisher Scientific) et les lamelles (48393 106, VWR) une fois complètement sèches. Les photos sont prises au Leica DMBL2 (Leica, Wetzlar, Allemagne) de la plateforme de microscopie photonique de l'Université de Sherbrooke.

2.14 Préparation pour la microscopie électronique

Les tissus sont coupés en petits morceaux d'environ 5 mm de longueur et sont fixés dans du glutéaldéhyde 2,5 % et conservés dans le fixateur à 4°C. Les échantillons sont envoyés à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke. Les photos sont prises au microscope électronique Hitachi H-7500 (Hitachi, Schaumburg, IL, É.-U.).

2.15 Mise en culture d'organoïdes

2.15.1 Organoides de jéjunum

Les morceaux de jéjunum d'environ 5 mm sont lavés dans le PBS froid et dans le PBS-EDTA 30 mM pendant 5 min. Le tissu est incubé dans le PBS-EDTA 30 mM pendant 20 min. Le surnageant est jeté et le tissu est resuspendu dans du PBS froid. Les cryptes sont isolées par brassage dans un tube de type Falcon 50 mL pendant environ 8 min ou jusqu'à ce que la quantité de cryptes isolées soit suffisante. Le surnageant est récolté, filtré sur un filtre de 70 µm (352350, Corning, Bedford, MA, É.U.) et centrifugé à 150 g à 4°C (Eppendorf 5810, Eppendorf, Hauppauge, NY, É-U) pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans du milieu Advanced DMEM/F12 +++ (12634-010, Life Technologies, Carlsbad, CA, É-U) (500 mL) avec 5mL de glutamax (35050-061, Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (330-050-EL, Wisent) et 2,5mL de pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent). Le tout est centrifugé à 150g à 4°C pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans du Matrigel jusqu'à la concentration de cryptes voulue etensemencé dans une plaque 48 puits (20 µL par puits). La plaque est mise dans un incubateur à 37°C avec 5% CO₂ pendant au moins 15 min pour laisser le Matrigel figer. Par la suite, 250 µL de milieu ENR est ajouté par puits. La composition du milieu ENR est la suivante: Advanced DMEM/F12 +++, 1,25 mM N-acétylcystéine (Sigma A9165), EGF 50ng/mL (Life Technologies PMG8045), milieu conditionné Noggin à 10%, milieu conditionné R-Spondine à 10%, Supplément B27 2% v/v (Life technologies 17504-044) et Supplément N2 1% v/v (Life technologies 17502-048). Les milieux conditionnés de R-Spondine et de Noggin ont été obtenus

grâce à des cellules 293T surexprimant la protéine d'intérêt et cultivées dans du milieu du DMEM, 10% FBS inactivé, glutamax 1% v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1% v/v (330-050-EL, Wisent) et penicilline/streptomycine 0.5% v/v (450-201-EL, Wisent). La sélection à la puromycine (1 µg/mL) est utilisée pour les cellules exprimant le Noggin et la sélection à la zéomycine (3 µg/mL) est utilisée pour les cellules exprimant la R-Spondine. Les cellules sont passées grâce à de la trypsine 0.05% dans des flasques T175 dans du milieu Advanced DMEM/F12 +++ et cultivées dans ce milieu à 37°C et 5% CO₂ pendant 7 jours. Le milieu est récolté, centrifugé à 1000 RPM pendant 5 min puis filtré sur filtre 0.22 µm.

2.15.2 Organoides de côlon

Le côlon est coupé en morceaux d'environ 5 mm de longueur et lavés à répétition dans le PBS (environ 10 lavages). Les morceaux de côlon sont ensuite incubés pendant 1h dans le PBS-EDTA 5 mM. Le PBS-EDTA 5 mM est enlevé et remplacé par du PBS. Les cryptes sont décollées par agitation des morceaux de tissus dans du PBS dans un Falcon 50 mL pendant environ 10-15 min ou jusqu'à ce que la quantité de cryptes soient suffisantes. Le surnageant est prélevé et centrifugé à 350g pendant 3 min (Eppendorf 5810). Le culot est lavé au PBS et re-centrifugé 2 fois. Le culot est resuspendu dans le Matrigel de la même façon que dans la section 2.15.1. Le milieu utilisé est du milieu ENR additionné de Wnt3a recombinant (0,15 µg/mL final) (ab81484, Abcam).

2.16 Culture d'organoïdes et passages

Le milieu des organoïdes est changé à tous les 3 jours. Les organoïdes de jéjunum sont pris en photo au jour 5 post-ensemencement au microscope Zeiss inversé Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les organoïdes de côlon sont pris en photo aux jours 5, 7 et 9 par le même microscope.

2.16.1 Passage d'organoïdes de jéjunum

Les organoïdes de jéjunum doivent être passés à tous les 7 jours. Le Matrigel doit être resuspendu dans 500 µL de milieu Advanced DMEM/F12 +++ froid. En utilisant une pipette de verre avec l'extrémité rapetissée à la flamme, le milieu avec les organoïdes est aspiré, refoulé 25 fois pour les organoïdes de souris *Dusp6*^{+/+} et 30 fois pour les organoïdes de souris *Dusp6*^{-/-}, puisque les organoïdes de souris *Dusp6*^{-/-} se dissocient plus difficilement, dans un total de 1,5mL d'Advanced DMEM/F12+++. Les organoïdes sont ensuite centrifugés à 150g pendant 5 min. Ils sont ensuite mis en culture tel que décrit dans la section 2.15.1.

2.17 Immunofluorescence d'organoïdes et incorporation EdU

Les organoïdes doivent être mis en culture dans une lab-tek (177445, ThermoFisher Scientific) et non dans un plaque 48 puits pour l'incorporation EdU et pour l'immunofluorescence.

2.17.1 Incorporation EdU

Les organoïdes sont incubés pendant 60 min avec 1mM d'EdU à 37°C. Les organoïdes sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4% (P6148, Sigma-Aldrich) dans du PBS pendant 60 min à la température de la pièce. Ils sont par la suite lavés 2 fois au PBS-BSA 3%. Les organoïdes peuvent également être rincés 2 fois au PBS et gardés dans le PBS à 4°C pendant plusieurs jours. Par la suite, ils sont perméabilisés au Triton X-100 5%/PBS pendant 20 min à température pièce. Après deux rinçages au PBS-BSA 3%, la réaction de détection de l'EdU est déclenchée avec 200 µL d'une solution contenant 172 µL de Click-iT® reaction buffer 1X (Tampon Tris), 8 µL de CuSO₄ 100 mM, 0,48 µL d'Alexa Fluor® azide 555, 20 µL de Reaction buffer additive (C10228, Click-iT® EdU Imaging Kit, Invitrogen) pendant 30 min à l'abri de la lumière à la température de la pièce. Après un rinçage au PBS-BSA 3%, les noyaux sont colorés avec une solution de Hoechst 33342 (C10228, Click-iT® EdU Imaging Kit, Invitrogen) à une concentration finale de 5µg/mL pendant 30 min à l'abri de la lumière à la température de la pièce. Les labtek sont ensuite rincées une fois au PBS, une fois à l'eau. La labtek doit être complètement à sec au moment du montage avec l'Immu-mount et la lamelle. Les photos sont prises au microscope inversé Olympus confocal FV1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) de la plateforme de microscopie photonique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke.

2.17.2 Immunofluorescence d'organoïdes

Les organoïdes sont fixés et perméabilisés tel que décrit dans la section 2.17.1. Après la perméabilisation, les organoïdes sont lavés au PBS-BSA 3%. Ils sont ensuite bloqués pendant 30 min à température pièce au PBS-BSA 3%. Les organoïdes sont incubés avec l'anticorps primaire dans le PBS-BSA 2 % sur la nuit. Après trois lavages au PBS-BSA 3%, les organoïdes sont incubés pendant 1 h avec les anticorps secondaires à température pièce à l'abri de la lumière. Après trois rinçages au PBS-BSA 3%, la coloration des noyaux et le montage des lames sont effectués tel que décrit dans la section 2.17.1. Les photos sont prises au microscope inversé Olympus confocal FV1000 de la plateforme de microscopie photonique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke.

2.18 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HT29 a été obtenue chez ATCC (HTB-38, American Type Culture Collection, Manassas, VA, É.U.) et a été isolée d'un adénocarcinome humain. Cette lignée cellulaire est cultivée

dans du milieu McCoy's 5A (317-010-CL, Wisent), 10% FBS, glutamax 1% v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1% v/v (330-050-EL, Wisent) et penicilline/streptomycine 0,5% v/v (450-201-EL, Wisent). La lignée cellulaire HCT116 a été aussi obtenue chez ATCC (CCL-247) et est isolée d'un carcinome humain. Elle est cultivée dans le même milieu que les cellules HT29. La lignée cellulaire Caco-2/15 provient d'un clone isolé de la lignée cellulaire Caco-2 provenant d'un adénocarcinome humain disponible chez ATCC (HTB 37). Elle a été obtenue du Pr Andrea Quaroni (Cornell University, NY, É.U.)

Les cellules sont incubées dans un incubateur à 37°C et à 5% CO₂. Le milieu des cellules est changé tous les deux jours et les cellules sont passées avant la confluence avec l'aide de la trypsine et les cellules sont diluées à une dilution finale de 1/8 pour les HT29, 1/10 pour les HCT116 et 1/5 pour les Caco-2/15.

2.19 Production de rétrovirus et infection des cellules

2.19.1 Production de rétrovirus

Les cellules 293T sont passées 1/10 la veille du jour de la transfection. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM 10% FBS avec 1% glutamax, 1% Hepes et 0.5% penicilline/streptomycine. La lipofectamine (48 µL, 11668-019, Invitrogen) est incubée pendant 5 min dans 750 µL d'Opti-MEM (31985-070, Thermo Fisher Scientific). Pendant cette incubation, un mélange de 750µL avec 7 µg de chaque plasmide est préparé. Le plasmide contenant le *shDUSP6* est un plasmide psuper-rétro contenant un gène de résistance à la puromycine (Transat, Saint-Priest, France). Les plasmides pVPack-vsv et pVPack-gp encodant les protéines d'encapsidation rétrovirales ont été utilisés. Les deux fractions de 750 µL sont combinées (celle contenant la lipofectamine et celle contenant les plasmides) et ce mélange est incubé pendant 20 min à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules dont le milieu a été remplacé par 5 mL d'Opti-MEM. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4h à 37°C à la suite duquel l'Opti-MEM est enlevé et remplacé par le milieu de culture des cellules. La récolte de virus a lieu 2 jours après la transfection. Le milieu est récolté et passé dans un filtre 0,45µm (4184, Pall, Port Washington, NY, É-U).

2.19.2 Infection des cellules

Les cellules à infecter sont passées la veille de l'infection. Le jour de l'infection, 1 mL de milieu contenant les virus est déposé dans le pétri de 100 mm avec du polybrène 8 µg/mL (Bromide d'hexadiméthrine, H9268-5G, Sigma-Aldrich). Les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C avec ce 1 mL de virus. Par la suite, 9 mL du milieu de culture approprié pour ces cellules à infecter est ajouté au pétri avec du polybrène 8 µg/mL. Les cellules sont incubées pendant 2 jours à 37°C. Suite à ces

deux jours, l'antibiotique de sélection, soit la puromycine (P9620, Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 5 µg/mL est ajoutée dans le milieu fraîchement changé. Des cellules non-infectées en présence de puromycine ont été utilisés comme contrôle pour déterminer lorsque la sélection était complète. Des populations stables ainsi sélectionnées ont été utilisées pour effectuer les expériences. La validation de la baisse d'expression de DUSP6 est ensuite effectuée par immunobuvardage.

2.20 Lyse cellulaire

Les cellules sont lysées sur glace pour ne pas modifier les statuts de phosphorylation des protéines. Les cellules sont rincées au PBS froid et sont lysées dans du tampon Laemmli 1X. Les lysats sont chauffés à 95°C pendant 5 min et soniqués à 25% d'amplitude pendant 5 sec (Sonic Dismembrator Ultrasonic Processor, Fisher Scientific). Avant d'être déposé sur gel d'immunobuvardage, du β-mercaptoethanol et du bleu de bromophénol à une concentration finale 1% v/v sont ajoutés aux lysats Laemmli.

2.21 Essais de migration/invasion à travers le Matrigel

Les essais d'invasion sont effectués avec les chambres d'invasion Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers (54480, Corning). Les inserts sont équilibrés avec du milieu sans sérum pendant 2h à 37°C. Les cellules sontensemencées dans 500 µL de milieu sans sérum sur le dessus de l'insert. En dessous de l'insert, le milieu sans sérum pour équilibrer la plaque est remplacé par 750 µL de milieu 20% FBS. Les cellules HT29 sontensemencées à 30 000 cellules par insert et sont incubées pendant 72h à 37°C, 5% CO₂. Les cellules HCT116 sontensemencées à 30 000 cellules par insert et sont incubées pendant 48h à 37°C, 5% CO₂. Pour arrêter l'essai d'invasion, les cellules sont fixées 2 min dans le méthanol 100% et les cellules sur le dessus de l'insert sont préalablement enlevées avec un coton-tige. Les cellules sont ensuite colorées au cristal violet 1% dans l'eau pendant 2 min et rincées dans l'eau. L'insert est monté sur une lame (12-552-3, Fisher Scientific) avec du Vectamount (Vector Labs, Burlington, CA, É.-U.). Le nombre de cellules invasives est ensuite compté au binoculaire.

2.22 Essais de croissance en agarose mou

L'agarose 1,4% (Agarose, low gelling temperature, A9045, Sigma) dans du PBS est préalablement envoyé à l'autoclave. Par la suite, 0,5 mL d'agarose 1,4% dans du PBS est mélangé avec 0,5 mL de milieu contenant 20% FBS McCoy's 5A, 2% Glutamax, 2% Hepes et 1% penicilline/streptomycine pour former une couche d'agarose dans le fond d'un puits d'une plaque 6 puits. Les cellules sont ensuite comptées etensemencées dans 1 mL de milieu 20% FBS McCoy's 5A et 1mL d'agarose

1,4%. Les cellules HT29 sontensemencées à 30 000 cellules par puits et les cellules HCT116 sontensemencées à 15 000 cellules par puits. Après avoir laissé refroidir l'agarose pendant au moins 20 min, 1mL de milieu 10% FBS McCoy's 5A est ajouté avec l'agent de sélection. Un mL d'eau stérile est ajouté dans la plaque pour éviter que l'agarose ne sèche. Le milieu est changé aux deux jours et ce, pendant au moins 2 sem. Les colonies sont colorées au MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (0,5mg/mL, 298-93-1, Bio Basics Canada Inc). Les colonies sont prises en photo à la lampe UV (MBI Lab Equipment)

2.23 Essais de migration par test de blessure

Les cellules Caco-2/15 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. À jour 0 de confluence, une blessure a été effectuée par aspiration avec une pointe de pipette de 200 μ L. Les cellules ont été cultivées dans du milieu avec et sans hydroxyurée (H8627-5G, Sigma-Aldrich) 2mM final et ce, jusqu'à la fermeture des blessures. La migration des cellules a été prise en photo à tous les jours au microscope Zeiss inversé Axiovert 200M. La superficie de la blessure a été calculée par calcul avec le logiciel ImageJ de l'aire recouverte par les cellules en ratio avec l'aire initiale de la blessure à 48h.

2.24 Analyses statistiques

Les analyses statistiques comparant deux groupes d'échantillons ont été faites en utilisant un test de Student à l'aide du logiciel GraphPad (Irvine, CA, USA) lorsque le test F indiquait une différence non significative entre les variances. Le test de Student a été utilisé en supposant que les échantillons suivaient une loi normale. En cas de différence significative entre les variances des conditions, un test de Mann-Whitney a été utilisé. Les différences entre les échantillons ont été considérées comme significatives lorsque les valeurs de p étaient * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ou *** $p \leq 0,001$. La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. Pour les décomptes du nombre de ramifications des organoïdes, un test de chi square a été utilisé à l'aide de Graphpad.

Résultats

1. Les rôles de la phosphatase DUSP6 dans le maintien de l'homéostasie de l'intestin grêle et du côlon

Le modèle de souris invalidées pour *Dusp6* a été initialement généré et utilisé pour étudier l'hypertrophie cardiaque où l'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 était observée. Ce groupe a également démontré cette hausse de phosphorylation et d'activité des kinases ERK1/2 dans le foie, la rate et le cerveau (Maillet et al., 2008). Par contre, le statut d'activation des ERK1/2 ainsi que le phénotype intestinal n'avaient pas été encore analysés dans ce modèle de souris.

1.1 La phosphorylation des ERK1/2 est augmentée chez les souris invalidées pour Dusp6

La phosphatase DUSP6 déphosphoryle spécifiquement les kinases ERK1/2 dans le cytoplasme (Kidger et Keyse, 2016). Nous avons donc vérifié le niveau de phosphorylation des ERK1/2 dans des extraits d'enrichissements de muqueuse de côlon distal de souris invalidées pour *Dusp6* âgées de 12 sem (Fig. 6). Nous avons tout d'abord validé la perte d'expression protéique de DUSP6 par immunobuvardage. Nous avons aussi observé l'hyperphosphorylation des ERK1/2 sur la thréonine 202 et la tyrosine 204 par immunobuvardage dans l'épithélium colique des souris invalidées pour *Dusp6* en comparaison à l'épithélium colique des souris contrôles. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de l'iléon soit la perte d'expression de DUSP6 associée à l'hyperactivation des kinases ERK1/2 (Fig. 7).

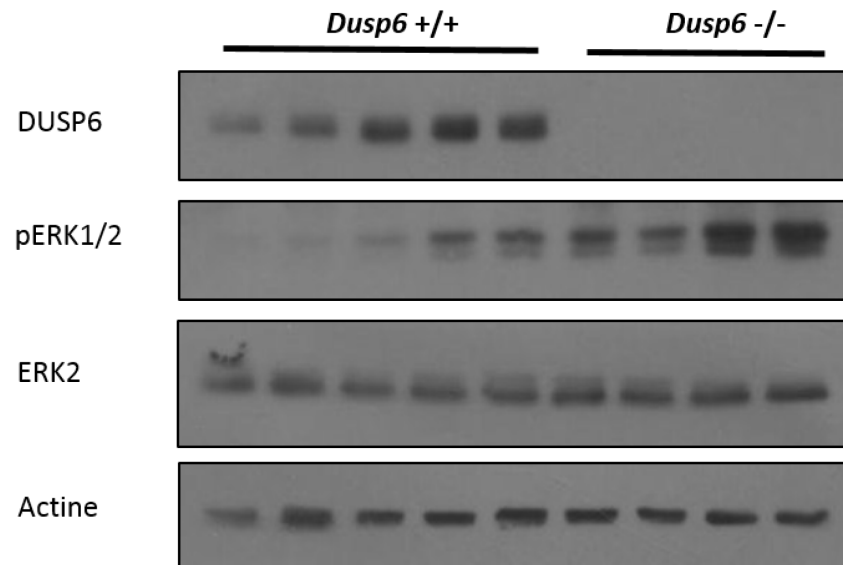


Figure 6 Augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 dans l'épithélium colique des souris invalidées pour *Dusp6*

La phosphorylation des ERK1/2 (pERK1/2) a été analysée par immunobuvardage dans des extraits d'enrichissement de muqueuse de côlon moyen de souris âgées de 12 sem. L'expression de DUSP6 a également été validée par immunobuvardage. L'expression de l'actine et de la protéine ERK2 a été analysée en guise de contrôle de charge. (n≥4)

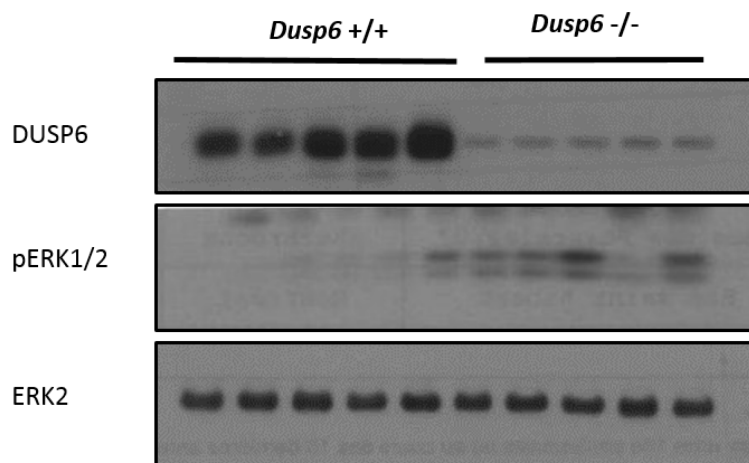


Figure 7 Augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 dans l'épithélium iléal des souris invalidées pour *Dusp6*

La phosphorylation des ERK1/2 (pERK1/2) a été analysée par immunobuvardage dans des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon de souris âgées de 12 sem. L'expression de DUSP6 a également été validée par immunobuvardage. L'expression de la protéine ERK2 a été analysée en guise de contrôle de charge. (n=5).

1.2 Les souris invalidées pour *Dusp6* présentent un allongement des cryptes et une augmentation de la prolifération cryptale dans le côlon.

Étant donné l'implication de la voie ERK/MAPK dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999; Garneau et al., 2009), nous nous sommes attardés à la prolifération cryptale dans le côlon moyen des souris contrôles et celles invalidées pour *Dusp6*. Tout d'abord, l'architecture du côlon a été analysée grâce à une coloration de coupes de côlon distal à l'hémaroxyline et éosine (Fig. 8A). Un allongement significatif des cryptes coloniques a été observé chez les souris invalidées pour *Dusp6* comparativement aux souris contrôles (Fig. 8B). Pour déterminer si cet allongement des cryptes concorde avec une augmentation de la prolifération cryptale, une immunohistochimie dirigée contre la protéine Ki67, un marqueur de cellules prolifératives, a été réalisée (Fig. 9A). Le nombre de cellules prolifératives a par la suite été compté et une augmentation significative du nombre de cellules prolifératives a été observée dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6* (Fig. 9B). Ces résultats démontrent que l'allongement des cryptes chez les souris invalidées pour *Dusp6* est probablement attribuable à une hausse de l'activité proliférative dans la crypte colonique. Ces analyses ont également été effectuées dans l'iléon proximal. De manière surprenante, aucune différence significative n'a été observée entre les souris contrôles et les souris expérimentales au niveau de la longueur des cryptes (Fig. 8C et D, coloration à l'hémaroxyline et éosine) et de la prolifération cryptale (Fig. 9B et C, immunohistochimie contre Ki67).

1.3 Expression de marqueurs de cellules souches dans le côlon

Comme l'augmentation de la longueur des cryptes et du nombre de cellules prolifératives peut notamment être due à une augmentation du nombre ou de l'activité des cellules souches, nous avons analysé par PCR quantitatif l'expression en ARNm de *Ascl2* et *Lgr5* qui sont tous deux des marqueurs des cellules souches CBCC (Fig 10A et B). Les résultats dans le côlon démontrent qu'il ne semble pas y avoir d'altération dans l'expression de ces deux marqueurs de cellules souches, suggérant ainsi que le nombre de cellules souches n'est pas augmenté chez les souris invalidées pour *Dusp6*.

1.4 La délétion de *Dusp6* dans le côlon favorise le développement d'organoïdes, ainsi que leur prolifération

Pour analyser l'activité des cellules souches et des cellules progénitrices, nous avons utilisé un modèle d'organoïdes. Le modèle d'organoïdes se base sur le renouvellement rapide de l'épithélium

grâce aux cellules souches multipotentes. C'est un modèle qui permet la génération d'un épithélium intestinal *ex vivo* contenant tous les types cellulaires différenciés à partir d'isolats de cryptes contenant les cellules souches (Sato et al., 2011). Pour analyser le développement de ces organoïdes de côlon, nous avons mesuré leur taille aux jours 5, 7 et 9 post-ensemencement (Fig. 11A). Nous avons observé une augmentation significative de la taille des organoïdes, à partir du jour 7, chez les organoïdes provenant des souris expérimentales par rapport à ceux provenant des souris contrôles (Fig. 11B), démontrant ainsi un développement plus rapide des organoïdes déficients pour *Dusp6*.

Pour investiguer si le développement plus rapide des organoïdes de côlon corrèle avec une augmentation de la prolifération, nous avons analysé l'incorporation à l'EdU (Fig. 12A), un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN lors de la réplication d'ADN. En effectuant un décompte du nombre de cellules positives à l'EdU, il est possible de compter le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire, puisque ces cellules sont en processus de synthèse de l'ADN (Bell et Dutta, 2002). Nous avons donc effectué un ratio du nombre de noyaux positifs pour l'EdU sur le nombre de cellules totales (obtenu grâce au marquage des noyaux au DAPI) pour obtenir un pourcentage de cellules prolifératives par organoïde (Fig. 12B). Nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de noyaux positifs pour l'EdU par organoïde dans les organoïdes expérimentaux comparés aux organoïdes contrôles confirmant ainsi une augmentation de la prolifération dans les organoïdes invalidés pour *Dusp6*.

1.8 La délétion de Dusp6 n'entraîne pas d'altération des cellules absorbantes ni des cellules entéroendocrines

Nous nous sommes ensuite intéressés à la différenciation des différents types cellulaires dans le côlon. Pour vérifier s'il y avait une altération de la différenciation des cellules absorbantes, un PCR quantitatif mesurant l'expression en ARNm d'un marqueur spécifique, *Slc26a3*, codant pour un transporteur d'ions chlore, a été réalisé. Aucune différence n'a été notée dans l'expression en ARNm de ce marqueur de colonocytes (Fig. 13A).

Au niveau des cellules absorbantes dans l'iléon, nous avons effectué un marquage de la sucrase-isomaltase par immunofluorescence (Fig. 13B). Nous n'avons pas observé de différence d'intensité de marquage entre les souris contrôles et expérimentales. Nous avons confirmé ce résultat grâce à un PCR quantitatif mesurant l'expression en ARNm de la sucrase-isomaltase (Fig. 13C). Le résultat de l'expression en ARNm de la sucrase-isomaltase a confirmé qu'il n'y a pas de variation de la quantité de cellules absorbantes dans l'intestin grêle des souris invalidées pour *Dusp6* par rapport aux souris contrôles.

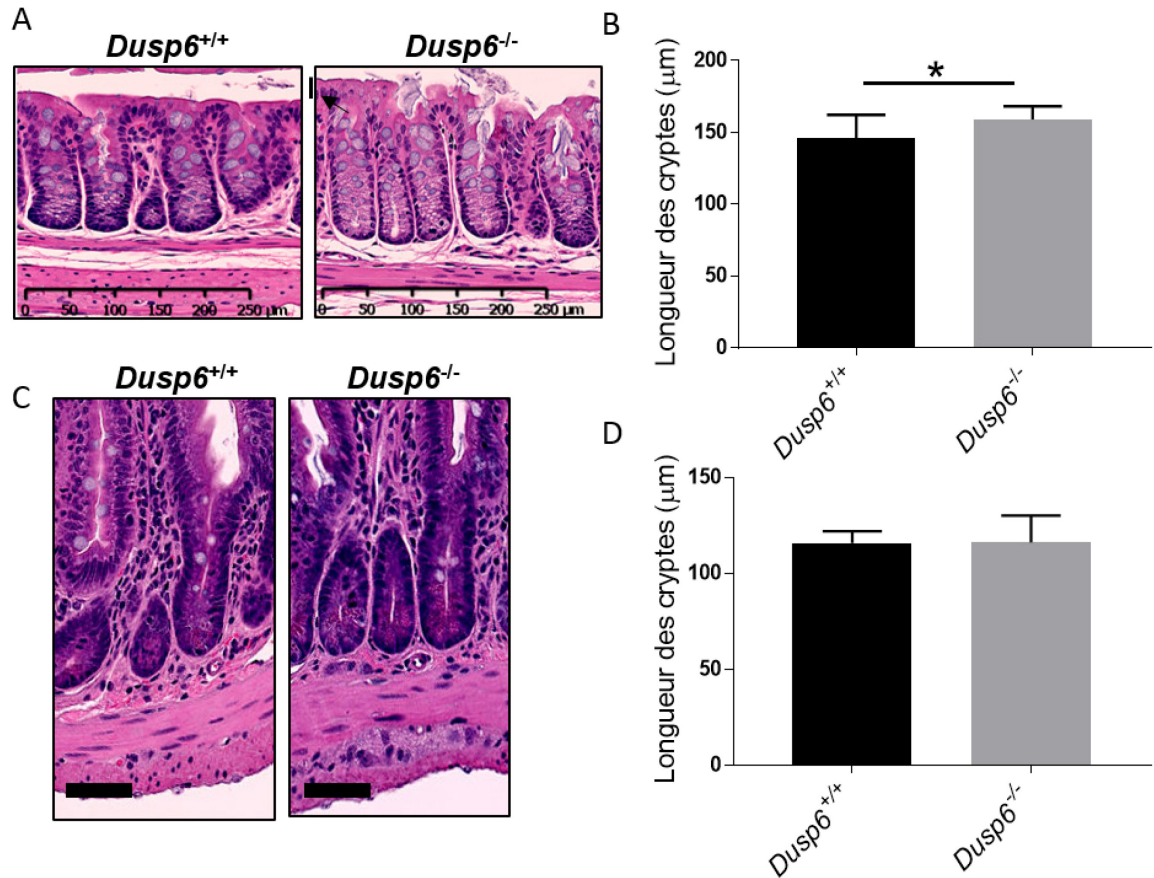


Figure 8 Les souris invalidées pour *Dusp6* présentent un allongement des cryptes dans le côlon

A) Coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes de côlon moyen. Barre de grossissement 250 µm. **B)** Mesure de la hauteur des cryptes de côlon moyen. Décompte de minimum 25 cryptes par souris (n=11, *p<0.05). **C)** Coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales à 12 semaines. Barre de grossissement 50 µm. **D)** Mesure de la hauteur des cryptes de l'iléon proximal. Décompte de minimum 25 cryptes par souris (n=8). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

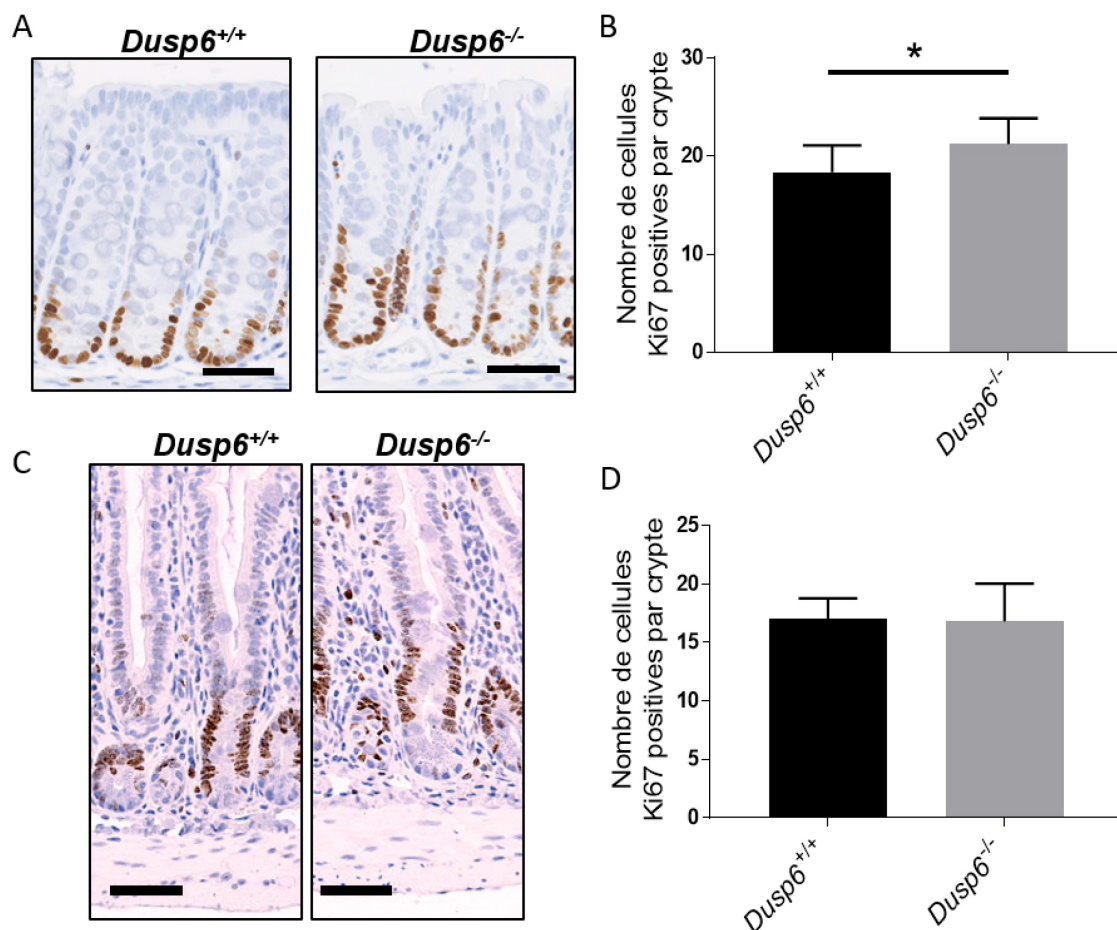


Figure 9 Les souris invalidées pour *Dusp6* présentent une hyperprolifération cryptale dans le côlon

A) Immunohistochimie contre Ki67 sur des coupes de côlon moyen de souris contrôles et expérimentales. Barre de grossissement 50 μ m. **B)** Décompte du nombre de cellules positives au Ki67 par crypte de côlon moyen. Décompte de minimum 25 cryptes par souris (n=12, *p<0.05). **C)** Immunohistochimie contre Ki67 sur des coupes d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales. Barre de grossissement 50 μ m. **D)** Décompte du nombre de cellules positives au Ki67 par crypte d'iléon proximal. Décompte de minimum 25 cryptes par souris (n≥7). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

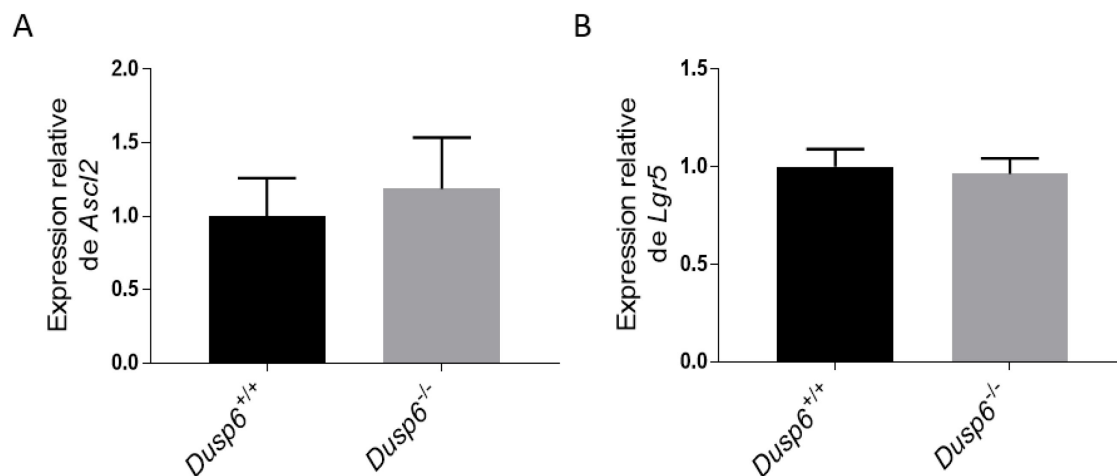


Figure 10 La délétion de *Dusp6* n'altère pas l'expression de marqueurs de cellules souches dans le côlon

A) et **B)** Expression relative en ARNm de *Ascl2* et *Lgr5* par qPCR dans un enrichissement de muqueuse de côlon moyen de souris âgées de 12 sem et normalisée sur l'expression des gènes de référence *Pum1*, *Tbp* et *Psmc4* ($n \geq 11$, $*p < 0.05$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

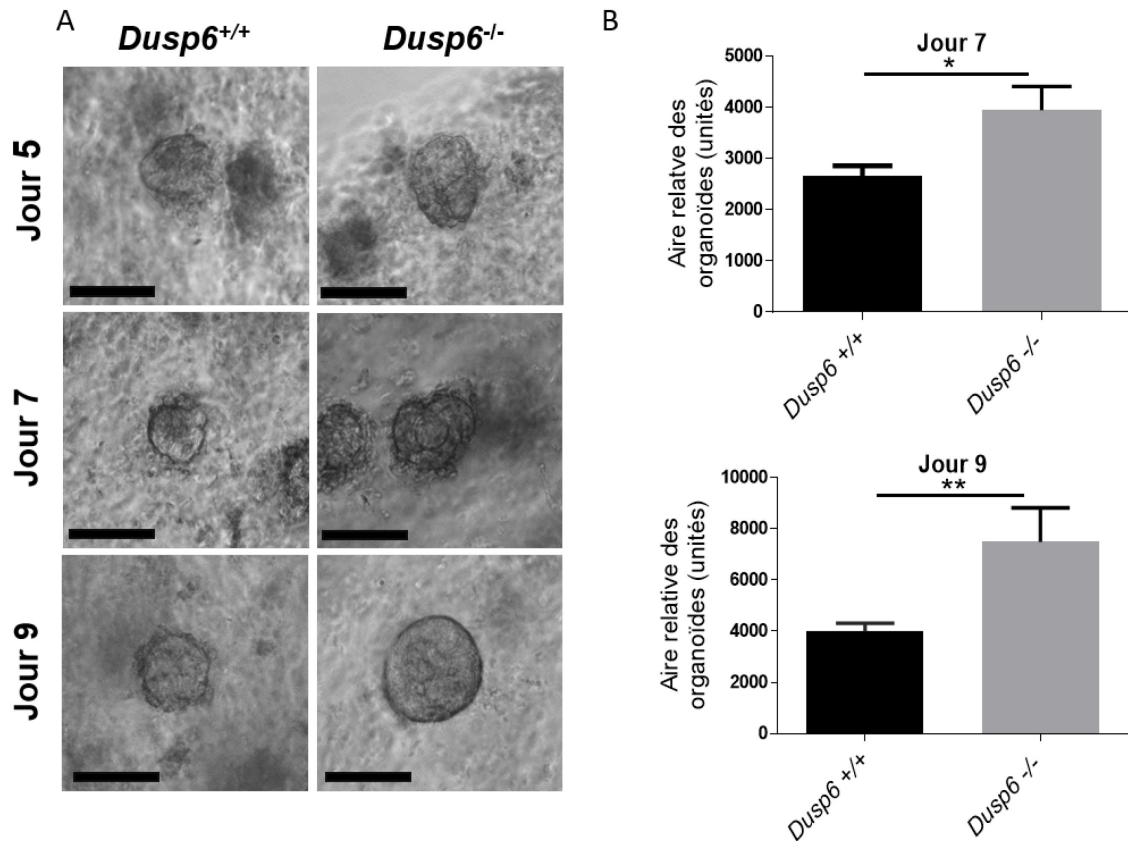


Figure 11 La délétion de *Dusp6* stimule la régénération épithéliale colique

A) Photos en contraste de phase d'organoïdes provenant de côlon de souris contrôles et expérimentales aux jours 5, 7, 9 post-ensemencement. Barre de grossissement 100 μ m. **B)** Mesure de l'aire relative des organoïdes de côlon provenant de souris contrôles et expérimentales aux jours 7 et 9. Décompte de minimum 20 organoïdes par condition (n=8, *p<0.05, **<0.001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

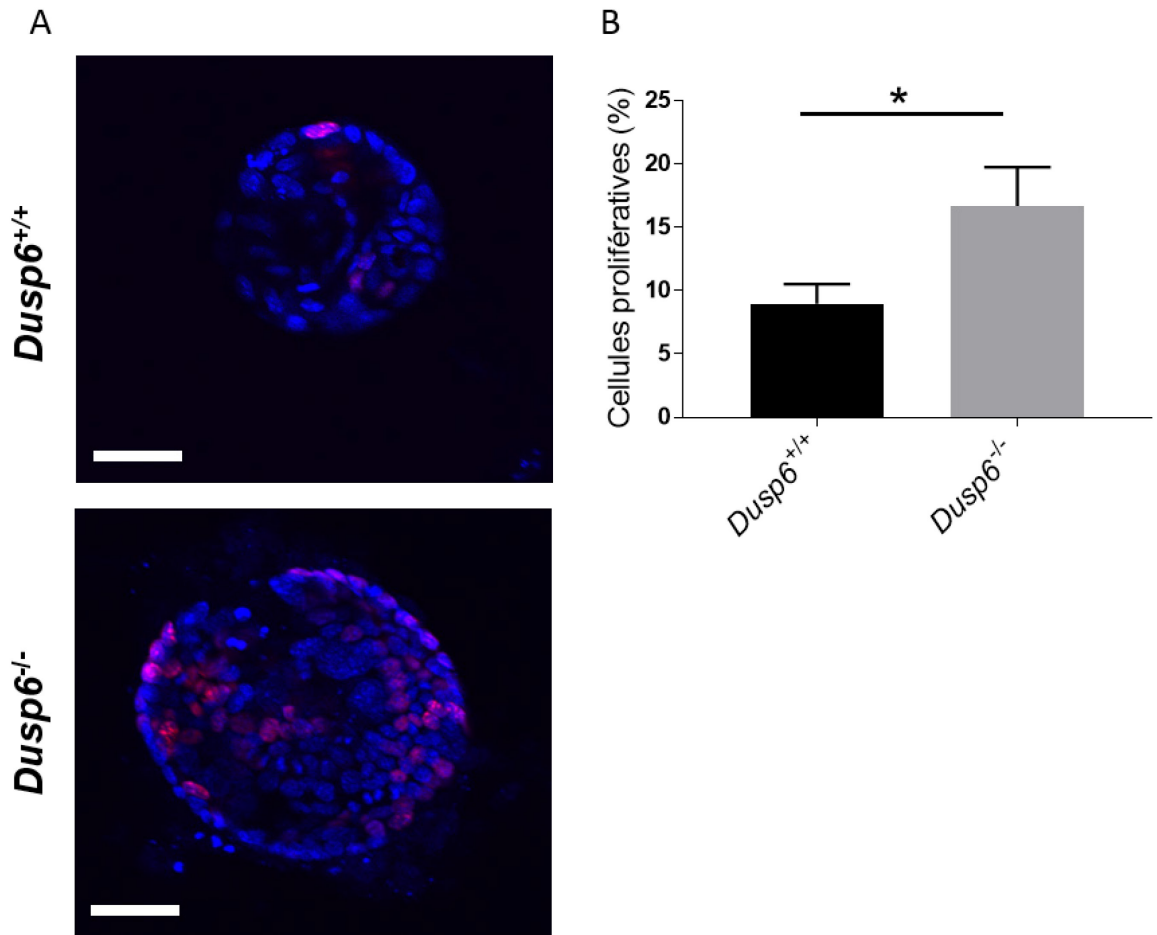


Figure 12 La délétion de *Dusp6* favorise la prolifération cellulaire dans les organoïdes de côlon après 5 jours post-ensemencement

A) Incorporation EdU (Rose) révélée par réaction chimique et coloration des noyaux au DAPI d'organoïdes de côlon. Barre de grossissement 100 μ m. (n=2, décompte de minimum 15 organoïdes)

B) Pourcentage de cellules prolifératives par organoïde. Décompte minimum de 15 organoïdes (*p<0.05). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

Pour la différenciation des cellules entéroendocrines, nous avons effectué une immunofluorescence contre la chromogranine A, un marqueur de cellules entéroendocrines (Fig. 14A et C). Par la suite, le décompte du nombre de cellules positives à la chromogranine A a été effectué et aucune différence n'a été observée dans le nombre de cellules entéroendocrines, autant au niveau du côlon (Fig. 14B) qu'au niveau de l'iléon (Fig. 14D).

1.9 La différenciation des cellules caliciformes dans l'intestin grêle et le côlon

Pour visualiser les cellules caliciformes, une coloration à l'Alcian Bleu, marquant les mucines acides présentes dans les granules de sécrétion des cellules caliciformes, a été réalisée (Fig. 15A et C). Un décompte du nombre de cellules marquées à l'Alcian Bleu a par la suite été effectué. Nous avons observé une augmentation significative du nombre de cellules caliciformes dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6* (Fig. 15B); cependant, dans l'iléon, il ne semble pas y avoir altération du nombre de cellules caliciformes (Fig. 15D). Pour valider si l'augmentation du nombre de cellules caliciformes résultait en une augmentation de l'épaisseur de la couche interne de mucus sécrété dans le côlon, nous avons effectué une fixation au Carnoy, qui permet de garder les deux couches de mucus intactes dans le côlon. Par la suite, une coloration à l'Alcian bleu permet de visualiser les mucines acides présentes dans les deux couches de mucus (Fig. 16A). Suite à cette coloration, une augmentation significative de l'épaisseur de la couche protectrice interne de mucus a été notée dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6* (Fig 16B).

Finalement, nous avons vérifié si l'augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus pouvait également être due à une augmentation du nombre de granules de sécrétion ou de la taille des cellules caliciformes. Pour ce faire, nous avons visualisé par microscopie électronique les cellules caliciformes dans le côlon (Fig. 17A) pour effectuer des décomptes du nombre de granules de sécrétion et mesurer la taille des cellules caliciformes. Nous n'avons pas observé de différence, ni dans le nombre de granules de sécrétion (Fig. 17B), ni dans la taille des cellules caliciformes (Fig. 17C) suggérant ainsi que l'augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus interne est plutôt attribuable à une augmentation du nombre de cellules caliciformes qu'à une augmentation de la sécrétion des mucines.

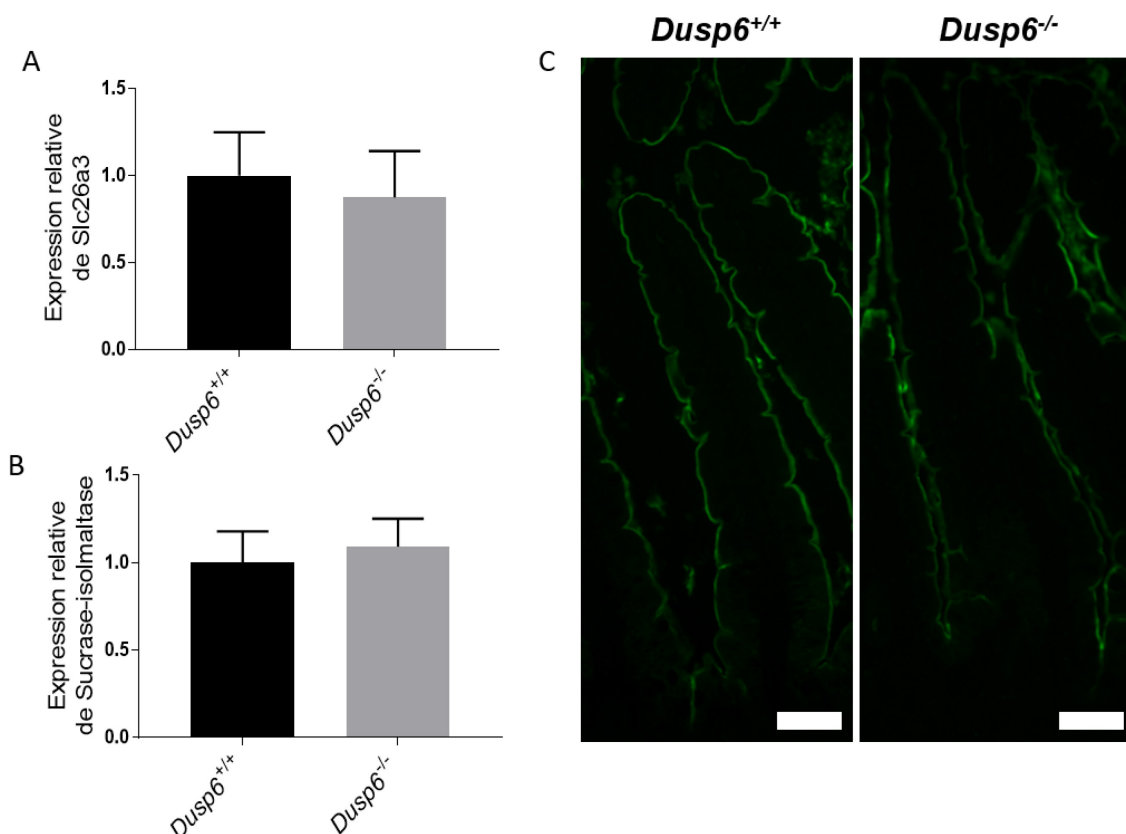


Figure 13 La délétion de *Dusp6* n'affecte pas la différenciation des cellules absorbantes

A) Expression relative en ARNm de *Slc26a3* dans des extraits d'enrichissement de muqueuse de côlon moyen de souris âgées de 12 sem et normalisée sur l'expression de gènes de référence *Pum1*, *Tbp* et *Psmc4* ($n \geq 7$). **B)** Expression relative en ARNm de la *sucrase-isomaltase* dans des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon distal de souris âgées de 12 sem et normalisée sur l'expression de gènes de référence *Pum1*, *Tbp* et *Psmc4*, ($n \geq 7$). **C)** Immunofluorescence contre la sucrase-isomaltase sur une coupe d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales à 12 sem. Barre de grossissement 50 μm , ($n=4$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

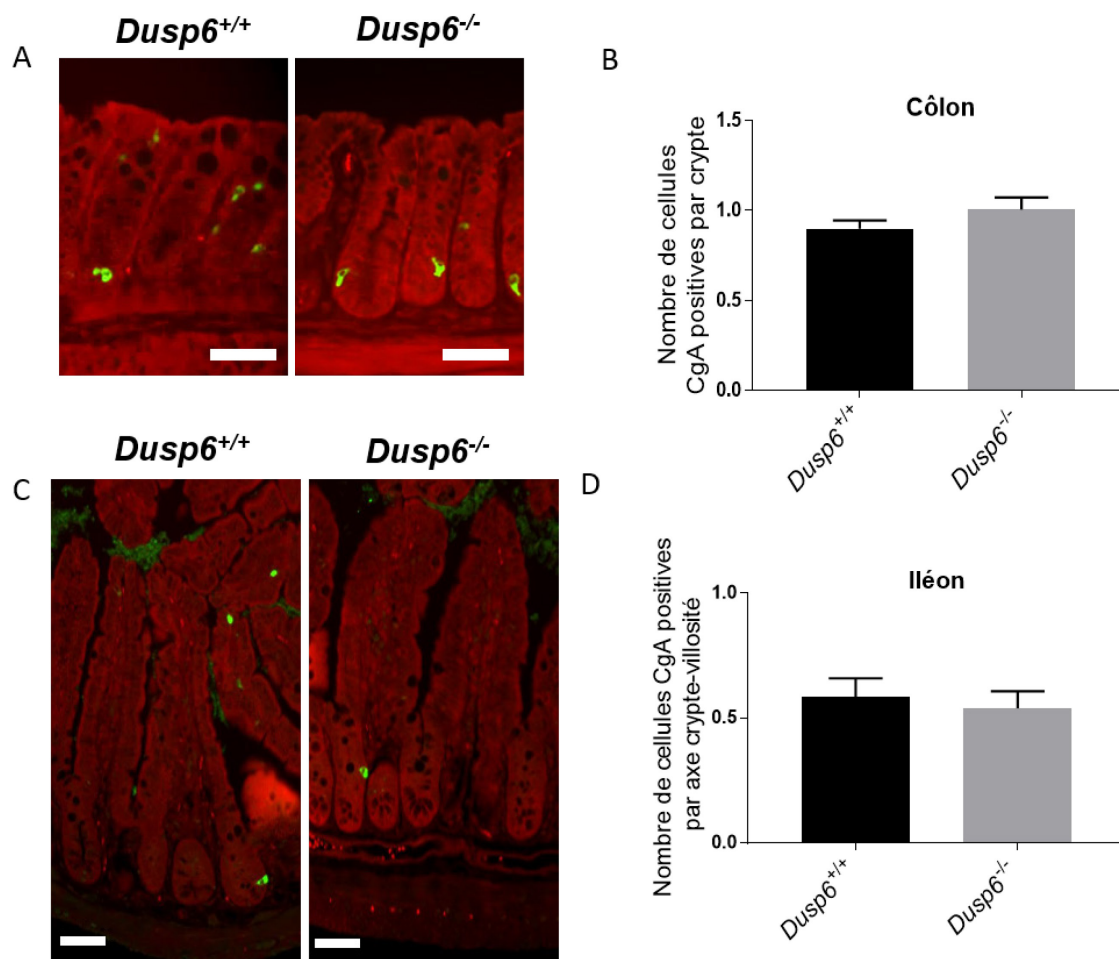


Figure 14 La délétion de *Dusp6* n'affecte pas la différenciation des cellules entéroendocrines

A) Immunofluorescence contre la chromogranine A (CgA) sur une coupe de côlon moyen de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. Barre de grossissement 50 μ m ($n \geq 7$). **B)** Décompte du nombre de cellules positives pour la chromogranine A par crypte de côlon moyen de souris âgées de 12 semaines. Décompte de minimum 45 cryptes par souris. **C)** Immunofluorescence contre la chromogranine A sur une coupe d'iléon distal de souris contrôles et expérimentales à 12 sem. Barre de grossissement 50 μ m ($n \geq 7$). **D)** Décompte du nombre de cellules positives à la chromogranine A par axe crypte-villosité d'iléon distal de souris âgées de 12 sem. Décompte de minimum 45 axes crypte-villosité par souris. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

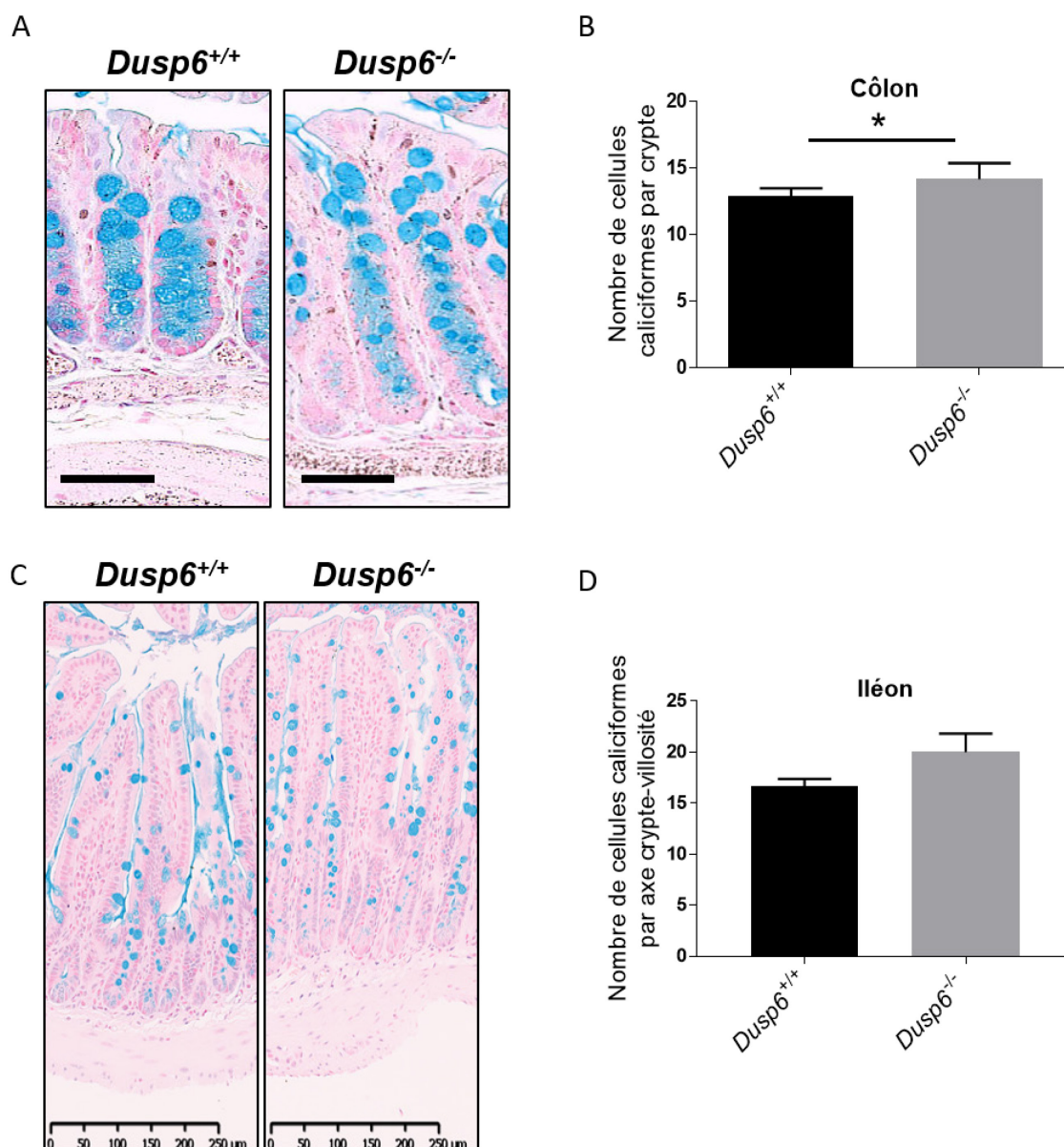


Figure 15 Augmentation du nombre de cellules caliciformes dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6*

A) Coloration à l'Alcian bleu d'une coupe de colon moyen de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. Barre de grossissement 50 μ m. **B)** Décompte du nombre de cellules colorées à l'Alcian bleu par crypte de côlon moyen. Décompte de minimum 15 cryptes par souris (n=7, *p<0.05). **C)** Coloration à l'Alcian bleu d'une coupe d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. Barre de grossissement 250 μ m. **D)** Décompte du nombre de cellules colorées à l'Alcian bleu par crypte d'iléon proximal. Décompte de minimum 15 axes crypte-villosité par souris (n=10-12, *p<0.05). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

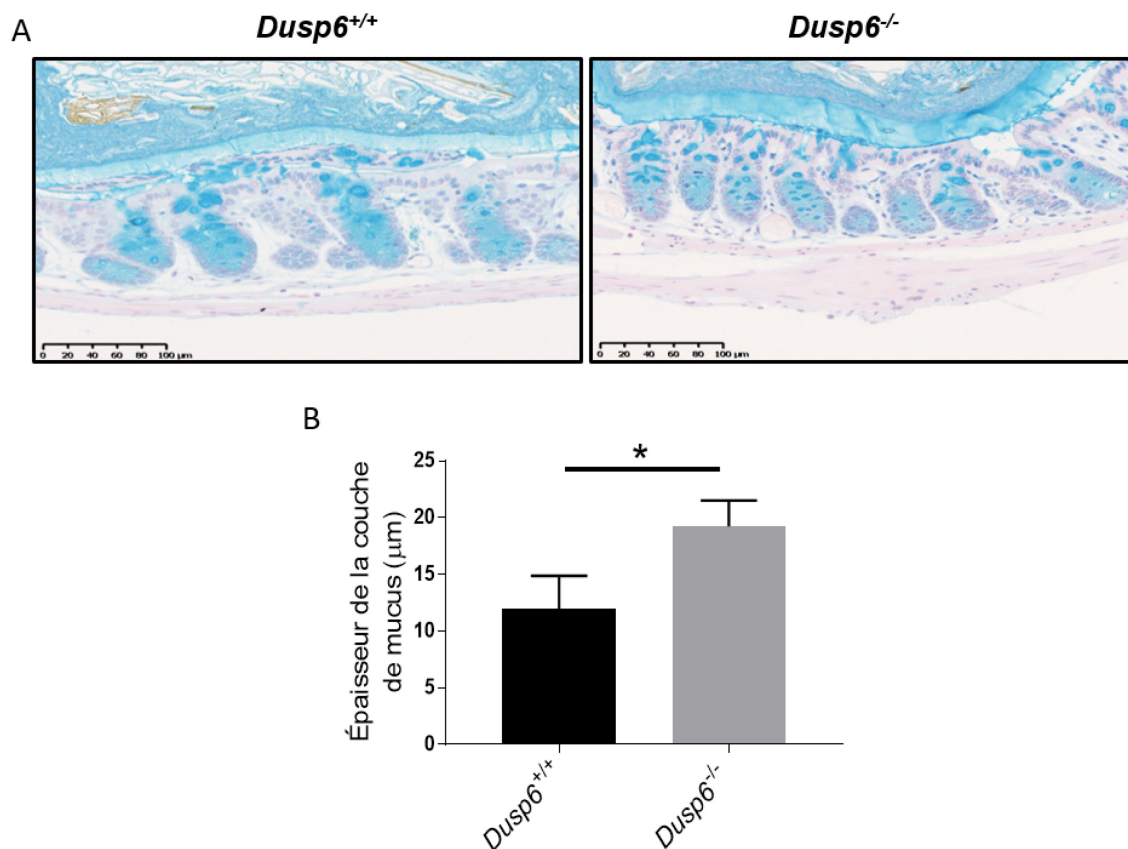


Figure 16 Augmentation de l'épaisseur de la couche interne de mucus chez les souris invalidées pour *Dusp6*

A) Coloration à l'Alcian bleu de coupe de côlon moyen fixé à la méthode Carnoy pour maintenir intacte la couche de mucus. Barre de grossissement 100 μm. **B)** Mesure de l'épaisseur de la couche de mucus en μm (* $p < 0.05$) (n=3-4). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

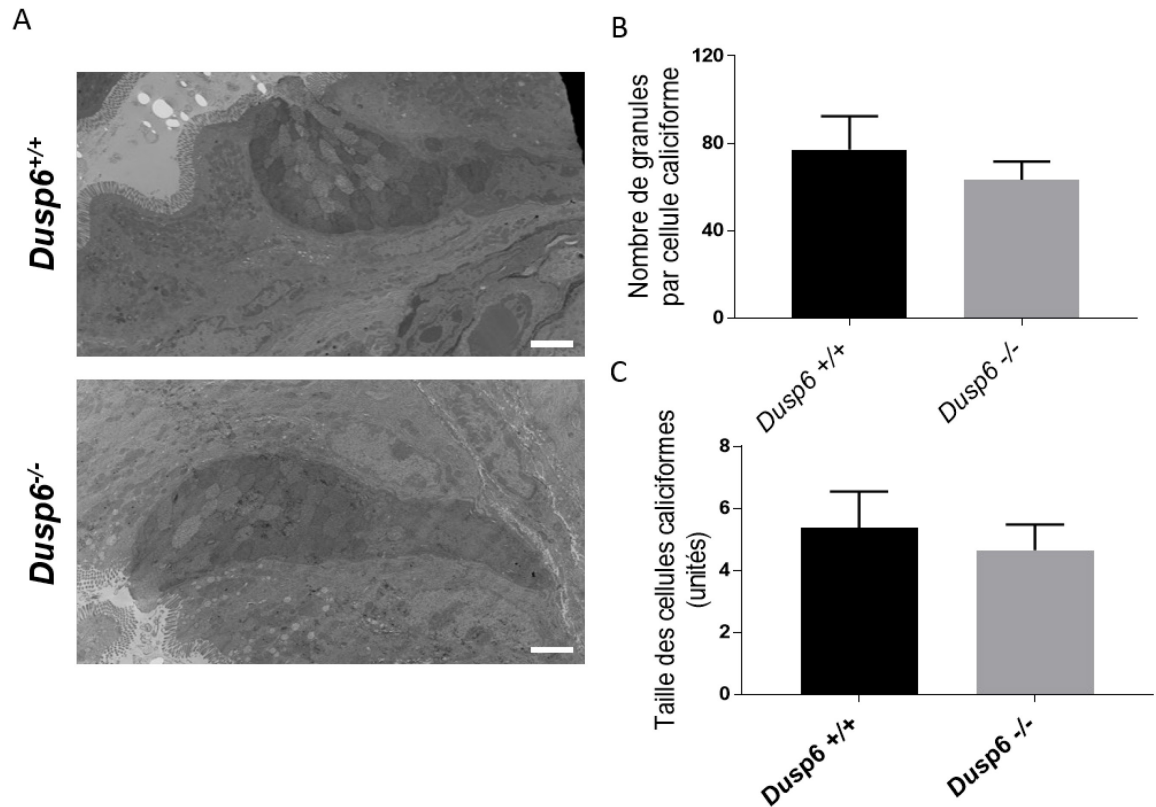


Figure 17 La morphologie des cellules caliciformes n'est pas altérée chez les souris invalidées pour *Dusp6*

A) Photos représentatives prises en microscopie électronique à transmission d'une cellule caliciforme d'une souris contrôle et d'une souris expérimentale âgées 12 sem. Barre de grossissement 2 μ m. **B)** Décompte du nombre de granules de sécrétion par cellule caliciforme ($n \geq 3$) **C)** Mesure de la taille des cellules caliciformes (unités) ($n \geq 3$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

1.10 La différenciation des cellules de Paneth

Pour effectuer un décompte du nombre de cellules de Paneth dans l'iléon, nous avons effectué une immunohistochimie dirigée contre le lysozyme, un peptide antimicrobien présent dans les granules de sécrétion des cellules de Paneth, ainsi qu'une coloration à l'Alcian bleu pour visualiser en parallèle les cellules à mucus (Fig. 18A). Le décompte du nombre de cellules positives au lysozyme a démontré une augmentation du nombre de cellules de Paneth dans les souris invalidées pour *Dusp6* (Fig 18B). Le marquage confirme la présence des cellules de Paneth matures, bien localisées au fond des cryptes tel qu'attendu au niveau des souris contrôles. Pour confirmer cette expansion du nombre de cellules de Paneth, nous avons réalisé un PCR quantitatif mesurant le niveau des transcrits de la défensine α (Fig. 19A) et du lysozyme (Fig. 19B), deux marqueurs des cellules de Paneth. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression des transcrits de ces deux marqueurs de Paneth, ce qui est en accord avec l'augmentation du nombre de cellules positives au lysozyme observées chez les souris invalidées pour *Dusp6*. Par contre, chez les souris expérimentales, bien que l'on puisse observer, tel qu'attendu, les cellules de Paneth au fond des cryptes (Fig. 18A), nous avons également noté la présence des cellules positives au lysozyme localisées au niveau des villosités ou du tiers supérieur des cryptes (Fig. 20A voir flèches). De manière intéressante, ces cellules sont également positives à l'Alcian bleu suggérant que ces cellules positives à la fois au lysozyme et à l'Alcian bleu sont probablement des cellules précurseurs aux cellules différenciées à mucus et de Paneth (Kamal et al., 2001; Shorning et al., 2009; Troughton et Trier, 1969). En effectuant un décompte de ces cellules doublement marquées, une accumulation de ces cellules précurseurs au phénotype intermédiaire a été observée chez les souris expérimentales (Fig. 20B).

Finalement, pour étudier la morphologie des cellules de Paneth, nous avons visualisé ces cellules en microscopie électronique. Tel que montré à la Fig. 21, nous n'avons pas noté de différence dans la morphologie cellulaire et dans les granules de sécrétion des cellules de Paneth des souris contrôles versus celles des souris expérimentales.

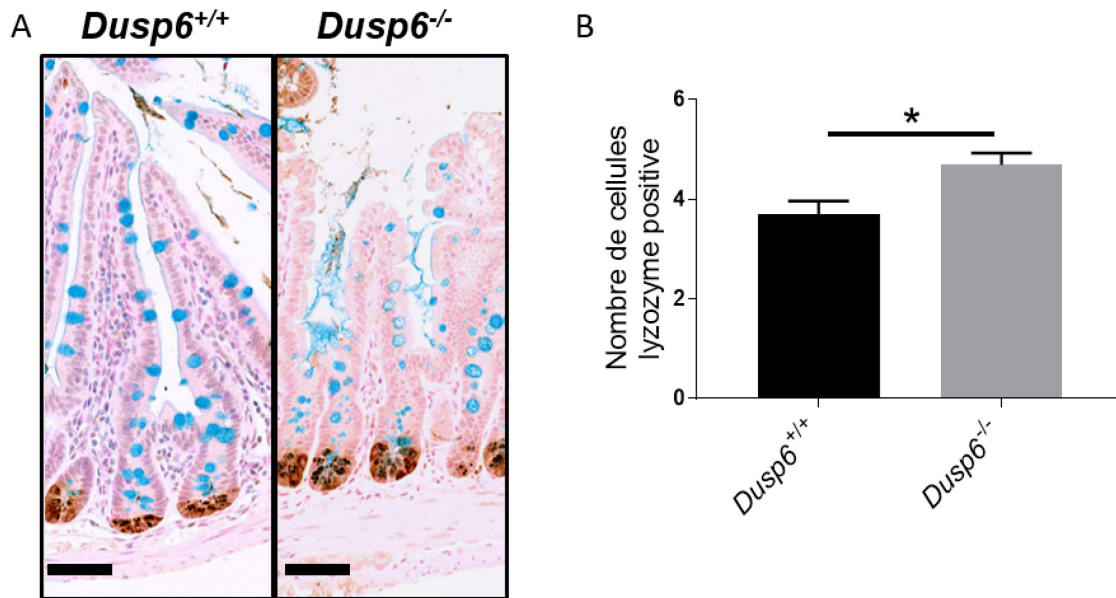


Figure 18 La délétion de *Dusp6* mène à une augmentation du nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle

A) Double marquage à l'Alcian bleu et contre le lysozyme (immunohistochimie) sur une coupe d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. Barre de grossissement 50 μ m. **B)** Décompte du nombre de cellules positives pour le lysozyme par crypte *($p < 0.05$) ($n=8$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

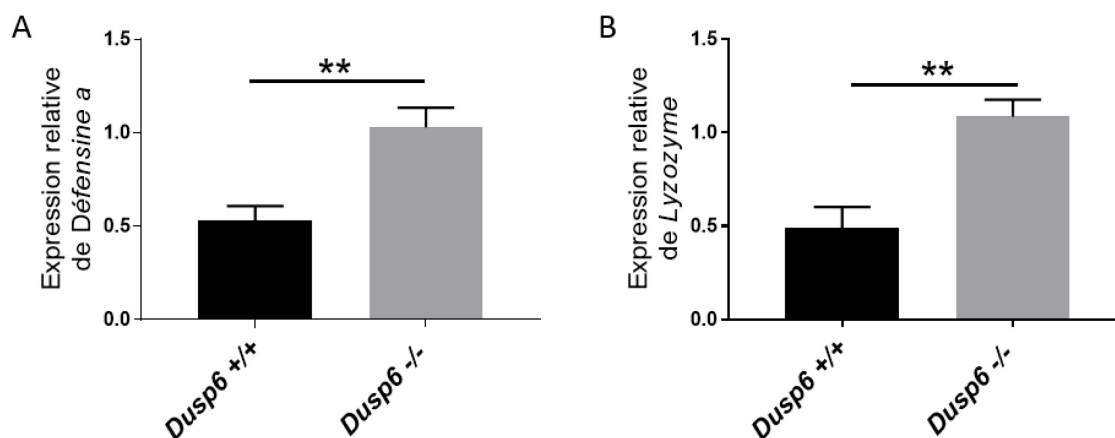


Figure 19 La délétion de *Dusp6* mène à une augmentation d'expression des marqueurs de différenciation des cellules de Paneth

A) et B) Expression en ARNm de la *Défensine a* et du *Lysozyme* en qPCR sur des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon distal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et normalisée sur l'expression de gènes de référence *Pum1*, *Tbp* et *Psmc4* (** $p < 0.001$) ($n \geq 7$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

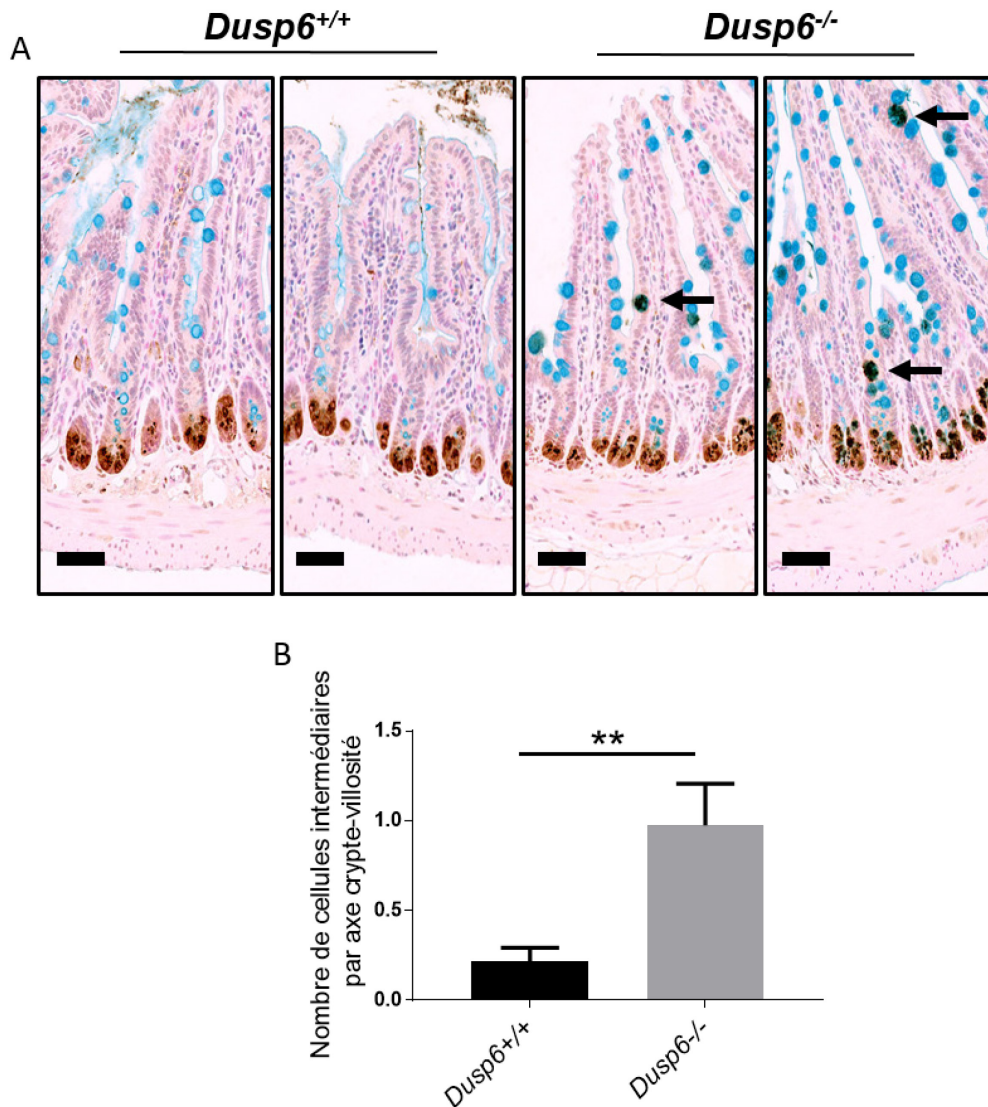


Figure 20 La délétion de *Dusp6* mène à une augmentation des cellules intermédiaires

A) Double marquage à l'Alcian bleu et contre le lysozyme sur une coupe d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. Barre de grossissement 50 μ m. **B)** Décompte du nombre de cellules positives au lysozyme ** ($p < 0.01$) ($n=8$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. Flèches : cellules doublement marquées.

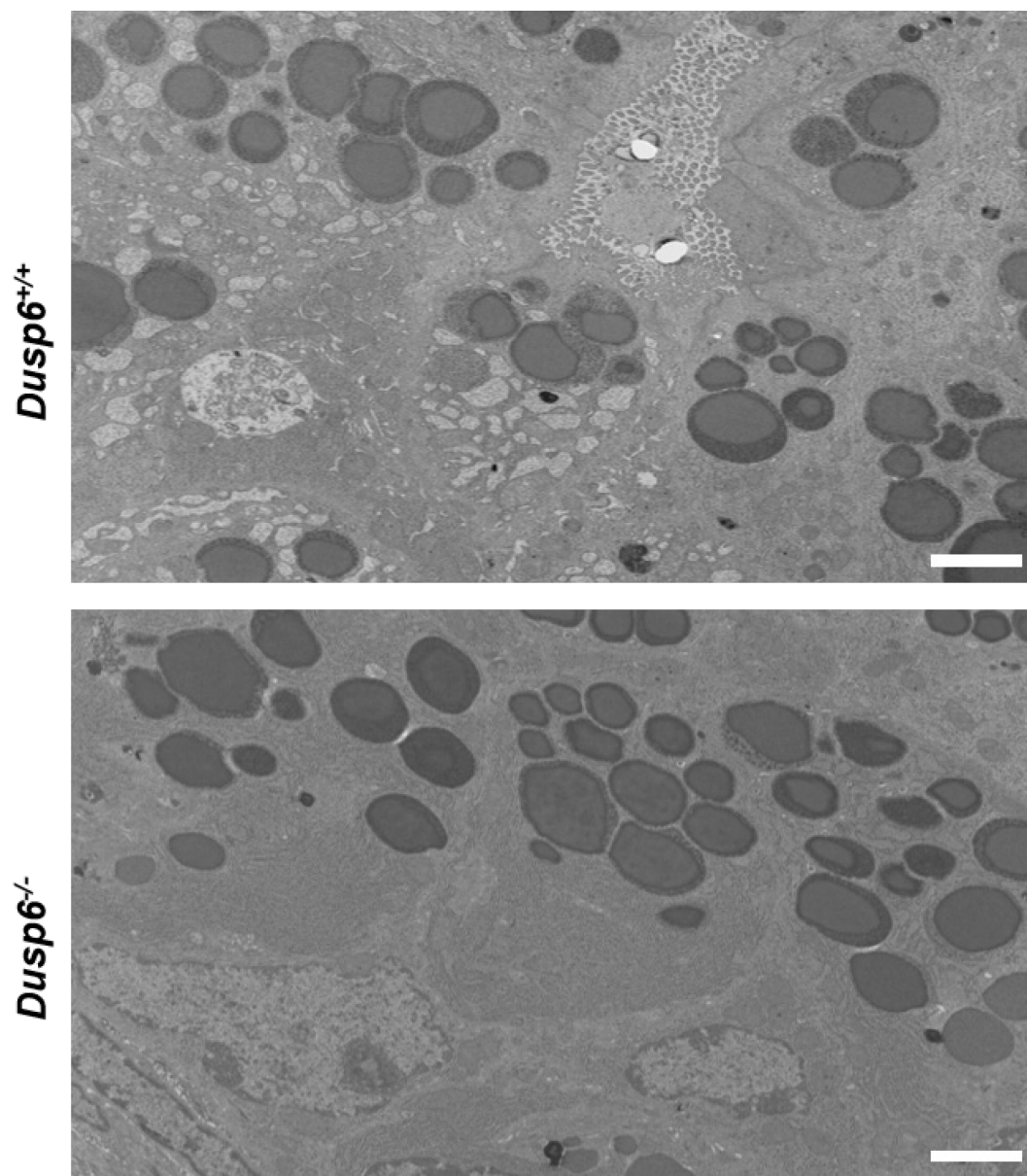


Figure 21 La morphologie des cellules de Paneth n'est pas altérée par la délétion de *Dusp6*

Photos représentatives prises en microscopie électronique à transmission de cellules de Paneth d'une coupe d'iléon proximal de souris contrôles et expérimentales âgées 12 sem. Barre de grossissement 2 μ m.

1.11 L'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le phénotype intestinal des souris invalidées pour *Dusp6*

Étant donné l'implication connue de la voie Wnt/ β -caténine non seulement dans le contrôle de la prolifération mais également dans la différenciation des cellules de Paneth (Mori-Akiyama et al., 2007) (Bastide et al., 2007), nous avons investigué l'expression de la β -caténine totale dans l'épithélium intestinal de nos souris. Pour ce faire, nous avons réalisé un immunobuvardage contre la β -caténine totale dans des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon (Fig 22A). De façon intéressante, nous avons alors observé une augmentation de l'expression totale de la β -caténine chez les souris invalidées pour *Dusp6*. Ce résultat suggère une activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules épithéliales intestinales des souris déficientes pour *Dusp6*. En effet, l'activation de cette voie conduit à l'inhibition de la dégradation de la β -caténine, résultant ainsi dans l'augmentation des niveaux protéiques totaux de la β -caténine. Il serait donc possible que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle dans le phénotype épithélial intestinal obtenu chez les souris invalidées pour *Dusp6*.

Nous avons également analysé l'expression de l'*Axine2* et d'*Ascl2*, deux gènes cibles du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF4 dans l'intestin (Jho et al., 2002; Jubb et al., 2006) (Fig. 22B et C). De manière surprenante, nous n'avons pas observé de différence significative dans le niveau des transcrits de l'*Axine2* et d'*Ascl2* chez les souris invalidées pour *Dusp6* comparativement aux souris contrôles. Par contre, rappelons que nous avons observé une augmentation significative de l'expression de la *Défensine a* (Fig. 20A) un autre gène cible de la voie Wnt (Beisner et al., 2014; Wehkamp et al., 2007).

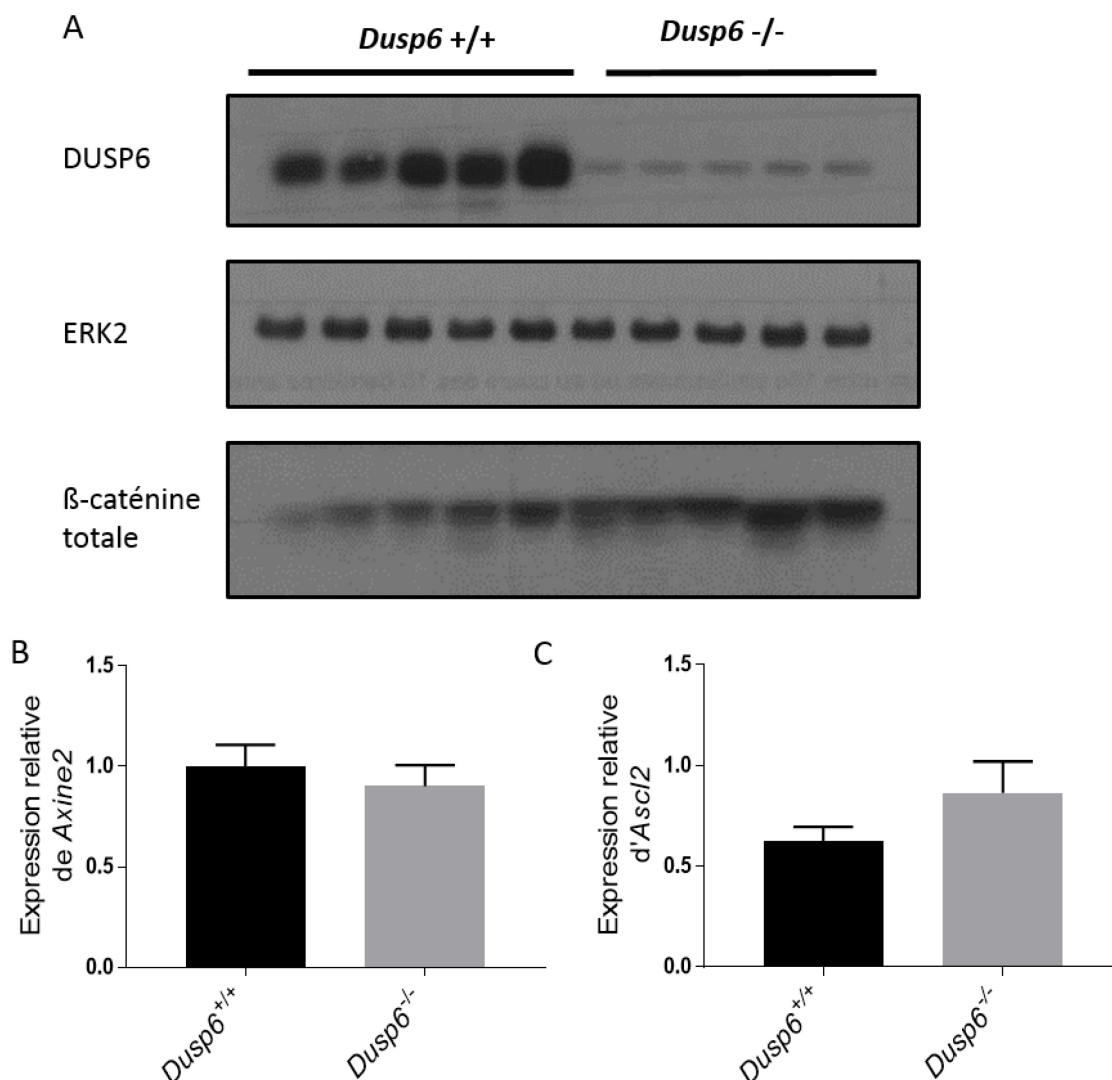


Figure 22 Augmentation de l'expression de la β-caténine dans l'épithélium iléal des souris invalidées pour *Dusp6*

A) Immunobuvardage contre DUSP6 et la β-caténine totale sur des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon distal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem. La protéine ERK2 est utilisée comme contrôle de charge. **B) et C)** Expression en ARNm de l'*Axine2* et d'*Ascl2* en qPCR sur des extraits d'enrichissement de muqueuse d'iléon distal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et normalisée sur l'expression des gènes de référence *Pum1*, *Tbp* et *Psmc4* ($n \geq 7$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

2. Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans la résistance à un stress inflammatoire

Suite à ces observations démontrant une prolifération accrue ainsi qu'une meilleure capacité de régénération (démontrée par le modèle d'organoïdes) et de production de cellules à mucus, nous nous sommes interrogés sur le rôle de Dusp6 dans la capacité de nos souris invalidées pour Dusp6 à résister un stress inflammatoire appliqué au niveau du côlon et par conséquent, au rôle de Dusp6 dans des maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.

2.1 Expression de DUSP6 dans la muqueuse de patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales

Pour déterminer l'implication de DUSP6 dans les maladies inflammatoires intestinales chez l'humain, nous avons analysé l'expression de *DUSP6* dans des tissus provenant de personnes atteintes de la colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn (Fig. 23). Nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression de l'ARNm *DUSP6* chez les personnes atteintes de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn soulevant la possibilité d'une implication facilitatrice de *DUSP6* dans le développement d'une inflammation chronique de l'intestin.

2.2 Les souris invalidées pour Dusp6 démontrent une résistance à l'induction d'une colite chimique

Pour déterminer l'implication de *DUSP6* dans le développement de la colite, nous avons utilisé un modèle de colite chimique, soit le modèle d'induction au DSS. Du DSS a donc été ajouté à une concentration de 2% dans l'eau de boisson des souris contrôles et expérimentales et ce, pendant 7 jours. Notre première observation a été que les souris contrôles traitées au DSS commencent à perdre du poids dès le jour 5 après le début du traitement (Fig. 24A). Par contre, les souris invalidées pour *Dusp6* perdent moins de poids que les souris contrôles (Fig. 24A). De plus, les souris contrôles présentaient plusieurs symptômes cliniques de colite après 7 jours. Un index d'activité de la maladie a donc été calculé à partir d'un score de 0 à 4 de la consistance des fèces, de saignements rectaux, de la dureté du côlon et de la présence de sang dans les fèces (Fig. 24B). Les souris invalidées pour *Dusp6* démontrent un index de la maladie moins élevé que les souris contrôles, ce qui indique que les souris invalidées pour *Dusp6* développent moins d'inflammation colique en réponse au DSS. Nous avons également analysé les dommages à la muqueuse et donc l'altération de l'architecture de l'épithélium grâce à une coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes de côlon (Fig. 25A). Différentes altérations telles que des abcès de cryptes ont été observées chez les souris contrôles. Cependant, l'analyse histologique de la muqueuse des souris invalidées pour *Dusp6* montrent que

ces souris sont nettement moins affectées par le traitement au DSS. Le calcul d'un score histologique des dommages tissulaires a été effectué basé sur la présence d'abcès de cryptes (score de 0 à 1), l'épaississement de la musculature (score de 0 à 3), la perte de cellules caliciformes (score de 0 à 1), l'infiltration des cellules immunitaires (score 0 à 1) et l'érosion de l'épithélium (score de 0 to 3). De manière intéressante, la Fig.25 nous montre que tel qu'attendu, les souris contrôles démontrent un score histologique assez élevé suite au traitement au DSS. Cependant, un score histologique significativement moins élevé a été observé chez les souris déficientes pour *Dusp6*. Ainsi, la délétion de *Dusp6* semble protéger la muqueuse colique d'un traitement au DSS.

Finalement, nous avons confirmé que le traitement au DSS ne modifiait pas l'augmentation de phosphorylation des ERK1/2 induite par la délétion de *Dusp6*. Pour ce faire, des souris ont été euthanasiées après 3 jours de traitement au DSS, soit juste avant l'apparition des dommages à la muqueuse et des symptômes cliniques. Un immunobuvardage contre pERK1/2 a permis de démontrer que la hausse de phosphorylation des ERK1/2 est maintenue chez les souris invalidées pour *Dusp6* traitées au DSS pendant 3 jours (Fig. 26).

2.3 La baisse d'expression de DUSP6 favorise la restitution cellulaire

Afin de vérifier le rôle de DUSP6 dans la restitution des cellules épithéliales intestinales, un modèle de cellules Caco 2/15 infectées avec un rétrovirus contenant une séquence shARN dirigé contre DUSP6. La diminution d'expression protéique de DUSP6 a tout d'abord été validée par immunobuvardage (Fig 27A). Par la suite, une monocouche de cellules Caco-2/15 a été blessée à l'aide d'une lame de rasoir et la migration cellulaire a été mesurée par la suite après 48h en présence d'hydroxyurée pour inhiber la prolifération. Tel qu'illustré à la Fig. 27 B et C, les cellules sous-exprimant DUSP6 migrent plus rapidement que les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que DUSP6 régule négativement la réparation de l'épithélium suite à une blessure.

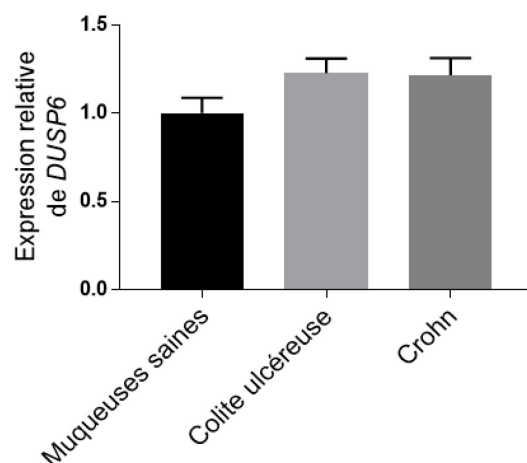


Figure 23 Expression des transcrits de DUSP6 chez les patients souffrant d'une maladie inflammatoire intestinale

Expression des transcrits de *DUSP6* dans des muqueuses de personnes atteintes de colite ulcéreuse (n=26) ou de maladie de Crohn (n=13) ou saines (n=7) en qPCR. L'expression en ARNm a été normalisée sur le gène de référence *PUM1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

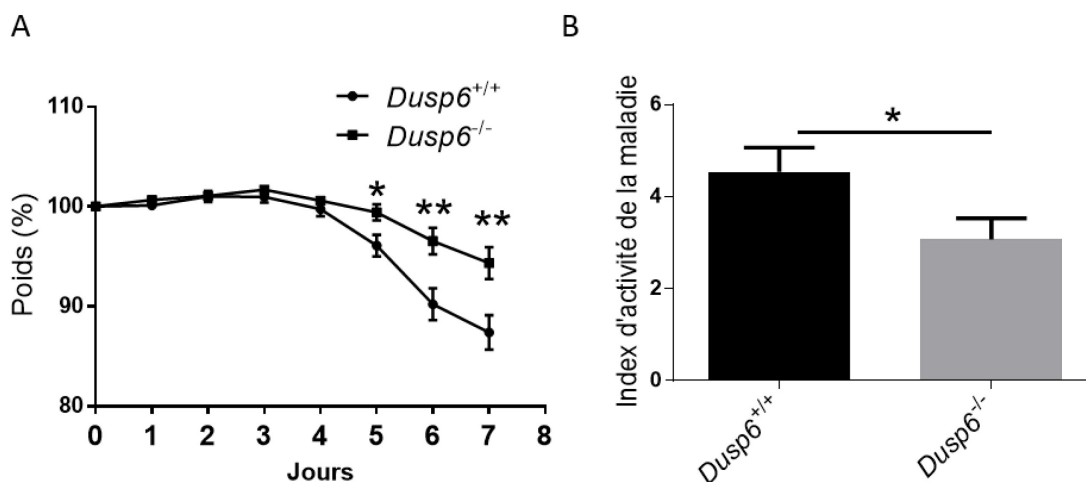


Figure 24 Les souris invalidées pour *Dusp6* développent une colite moins sévère suite au traitement au DSS

A) Courbe de poids des souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et traitées au DSS 2% dans l'eau de boisson pendant une semaine (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) ($n = 21$). **B)** Index d'activité de la maladie basé sur la consistance des fèces (0 à 4), les saignements rectaux (0 à 4), la dureté du côlon (0 à 4) et le sang dans les fèces (0 à 4) (* $p < 0.05$) ($n = 24$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

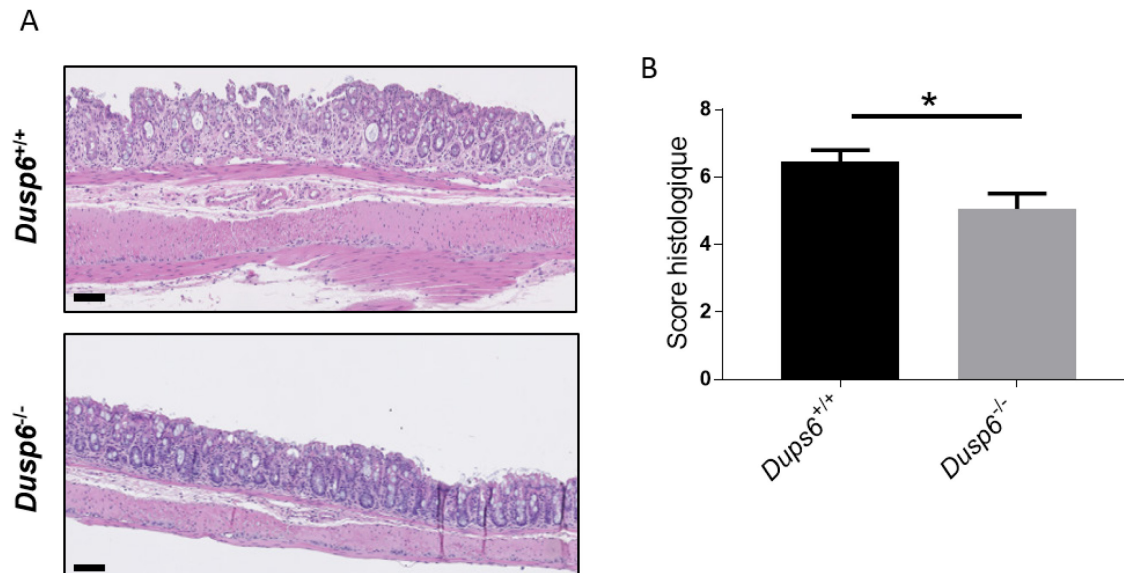


Figure 25 La muqueuse colonique des souris invalidées pour *Dusp6* est moins affectée par le traitement au DSS

A) Coloration à l'hématoxyline et éosine d'une coupe de côlon distal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et traitées au DSS 2% pendant 7 jours. Barre de grossissement 50 μ m. **B)** Score histologique des souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et traitées au DSS 2% dans l'eau de boisson pendant 7 jours basé sur la présence d'abcès de cryptes (0 à 1), l'épaississement de la musculature (0 à 3), la perte de cellules caliciformes (0 à 1), l'infiltration des cellules immunitaires (0 à 1) et l'érosion de l'épithélium (0 to 3). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne (* $p < 0.05$) ($n \geq 18$).

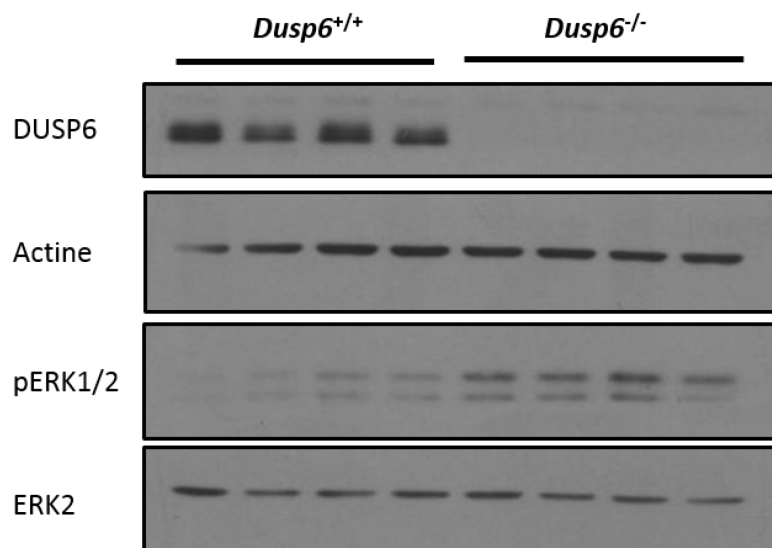


Figure 26 Maintien de l'hyperphosphorylation des ERK1/2 chez les souris invalidées pour *Dusp6* traitées au DSS

Immunobuvardage contre DUSP6 et phosphoERK1/2 (pERK1/2) sur des extraits totaux de côlon distal de souris contrôles et expérimentales âgées de 12 sem et traitées au DSS 2% dans l'eau de boisson pendant 3 jours. Immunobuvardage contre les protéines ERK2 et Actine a été réalisé pour contrôler la quantité de protéines (n=4).

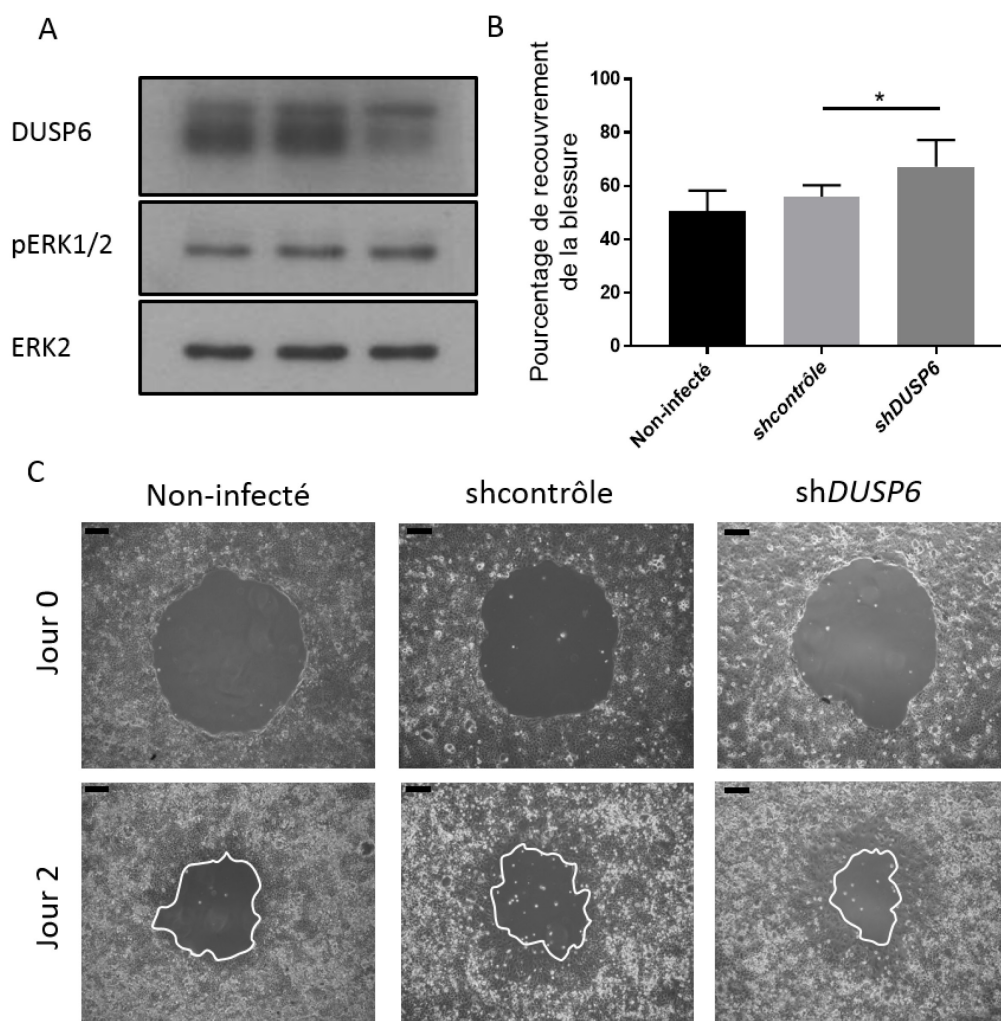


Figure 27 Les cellules Caco2/15 sous-exprimant DUSP6 possèdent une meilleure capacité de réparation de blessure

A) Immunobuvardage contre DUSP6 et phosphorylation des ERK1/2 (pERK1/2) dans des lysats de cellules Caco 2/15 exprimant de manière stable un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre la protéine ERK2 a été effectué en guise de contrôle de charge. **B)** Mesure du pourcentage de recouvrement de la blessure 48h après la blessure par calcul avec le logiciel ImageJ de l'aire recouverte par les cellules en ratio avec l'aire initiale de la blessure (* $p < 0.05$; $n = 7$). **C)** Photos représentatives prises en microscopie en contraste de phase de cellules exprimant un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN shcontrôle ou non infectées, et blessées à confluence par aspiration. Le processus de fermeture de la blessure a été examiné après 2 jours. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

3. L'implication de la phosphatase DUSP6 dans la tumorigenèse intestinale

Étant donné l'implication de la voie RAS/MAPK dans la tumorigenèse intestinale (Fang et Richardson, 2005), ainsi que l'augmentation de la prolifération dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6*, nous nous sommes intéressés à l'implication de la phosphatase DUSP6 dans le développement du cancer colorectal. En effet, des mutations au niveau des oncogènes *KRAS* et *NRAS* sont répertoriées dans plus de 40% des cancers colorectaux et les mutations dans l'oncogène *BRAF* sont retrouvées dans 9 à 11% des cancers colorectaux (Davies et al., 2002; Pretlow et Pretlow, 2005; Rajagopalan et al., 2002; D.-L. Worthley et al., 2010)

3.1 L'expression de DUSP6 dans des tumeurs colorectales humaines

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression de DUSP6 dans des tumeurs colorectales humaines à différents stades. Nous avons donc analysé le niveau des transcrits de *DUSP6* dans des tumeurs paires issues de la biobanque de la Pre Julie Carrier (voir matériel et méthodes). De façon intéressante, l'expression de *DUSP6* est diminuée dans les tumeurs colorectales comparativement à la marge saine de la même patiente ou du même patient (Fig. 28A). Cette baisse d'expression est plus évidente dans les stades avancés, devenant significative aux stades 2, 3 et 4 (Fig. 28B). Ces résultats suggèrent que la délétion de *Dusp6* pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale.

3.2 La délétion de *Dusp6* dans un modèle tumorigenèse *Apc*^{Min/+} favorise la formation d'adénomes

Pour étudier le rôle de DUSP6 dans l'initiation de la tumorigenèse colorectale, nous avons utilisé un modèle de souris *Apc*^{Min/+}, des souris qui forment spontanément des adénomes dans l'intestin. Les souris *Apc*^{Min/+} possèdent une mutation encodant la forme tronquée d'*Apc* sur une des deux allèles. Puisque le gène *APC* est la plupart du temps le premier gène muté durant la carcinogenèse colorectale chez l'humain, ces souris représentent donc un bon modèle d'initiation tumorale dans l'intestin (Esteller et al., 2000; Powell et al., 1992). Nous avons donc croisé les souris *Dusp6*^{-/-} avec les souris *Apc*^{Min/+} et analysé la tumorigenèse chez les souris expérimentales. Autant dans l'intestin grêle que dans le côlon, nous avons obtenu une augmentation du nombre d'adénomes formés chez les souris invalidées pour *Dusp6* comparées aux souris *Apc*^{Min/+} contrôles (Fig. 29A et B). La délétion de *Dusp6* semble donc favoriser la tumorigenèse intestinale induite par l'inactivation d'*Apc*, du moins chez la souris.

Pour vérifier l'implication de la signalisation ERK/MAPK et Wnt/ β -caténine dans l'augmentation de la tumorigenèse induite dans les souris *Apc*^{Min/+}; *Dusp6*^{-/-}, la phosphorylation des ERK1/2 et

l'expression de la β -caténine totale ont été analysées par immunobuvardage (Fig. 30A). Tel qu'attendu, la phosphorylation des ERK1/2 semble plus élevée dans les marges saines des souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}$ que dans les marges saine des souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}$. De manière intéressante, une augmentation de la β -caténine totale a été aussi observée dans les marges saines des souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}$ comparativement aux marges saines des souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}$. De plus, autant dans les polypes de souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}$ que dans les polypes de souris $Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}$, il y a une augmentation non-significative de la phosphorylation des ERK1/2, démontrée par la densitométrie (Fig 30 B) et de l'expression de la β -caténine totale, également démontrée par la densitométrie (Fig 30 C).

3.3 La baisse d'expression de DUSP6 chez les cellules HT29 mène à une augmentation de leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage et de leur capacité invasive

Pour étudier l'implication de DUSP6 dans les propriétés tumorales de cellules cancéreuses colorectales humaines, nous avons infecté les cellules HT29 avec un rétrovirus exprimant un shARN ciblant la séquence codante de *DUSP6*. Nous avons d'abord validé la perte d'expression de DUSP6 en immunobuvardage (Fig. 31). L'immunobuvardage contre DUSP6 démontre une baisse d'expression de DUSP6 de 63 % dans les cellules exprimant le shARN contre DUSP6 comparativement aux cellules non infectées ou et de 33% comparativement aux cellules infectées avec un virus contenant un shARN contrôle. De plus, nous avons voulu déterminer si la sous-expression de DUSP6 menait à une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2. Pour ce faire, nous avons analysé la phosphorylation des ERK1/2 par immunobuvardage et tel qu'attendu, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2.

Nous avons ensuiteensemencé ces cellules dans de l'agarose mou afin d'étudier leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage. De manière intéressante, après 14 jours, les cellules sous-exprimant DUSP6 forment significativement plus de colonies que les cellules contrôles (Fig. 32A). De plus, les colonies sous-exprimant DUSP6 sont plus grosses que les colonies contrôles (Fig. 32B). Ainsi, DUSP6 régule négativement la croissance en indépendance d'ancrage des cellules colorectales cancéreuses HT29.

Pour évaluer la capacité d'invasion de ces cellules, nous avons effectué un essai d'invasion en matrigel. Les cellules sous-exprimant DUSP6 ont traversé la membrane de matrigel en plus grand nombre que les cellules contrôles, bien que de façon non-significative (Fig. 32C). Ces résultats suggèrent donc que DUSP6 diminue la capacité d'invasion des cellules HT29.

3.4 La baisse d'expression de DUSP6 chez les cellules HCT116 n'affecte pas leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage et leur capacité invasive

Afin de bien caractériser l'implication de DUSP6 dans les cellules cancéreuses colorectales, nous avons aussi infecté des cellules HCT116 avec le rétrovirus exprimant le shARN dirigé contre DUSP6. De la même façon que pour les cellules HT29, nous avons validé l'inhibition d'expression de DUSP6 en immunobuvardage (Fig. 31). L'immunobuvardage contre DUSP6 démontre une baisse d'expression de DUSP6 de 70 % dans les cellules exprimant le shARN contre DUSP6 comparativement aux cellules non infectées ou de 75 % comparativement aux cellules infectées avec un virus contenant un shARN contrôle. Nous avons également validé la phosphorylation des ERK1/2 par immunobuvardage et de façon étonnante, nous n'avons pas observé de différence dans les niveaux de phosphorylation des ERK1/2 entre les cellules infectées avec un shARN contrôle et non-infecté comparé aux cellules infectées avec un shARN dirigé contre *DUSP6*.

De façon étonnante, lorsque nous avons ensemencé les cellules dans de l'agarose mou, nous avons obtenu aucune différence dans le nombre de colonies formées lorsque l'expression de DUSP6 était inhibée (Fig. 33A). De plus, les cellules HCT116 sous-exprimant DUSP6 ne démontrent pas de hausse de leur capacité invasive en comparaison aux cellules contrôles (exprimant un shARN contrôle ou non infectées) (Fig. 33B). Ces résultats suggèrent que la baisse d'expression de DUSP6 chez les cellules HCT116 n'altère pas leur potentiel de croissance en indépendance d'ancrage et leur potentiel invasif.

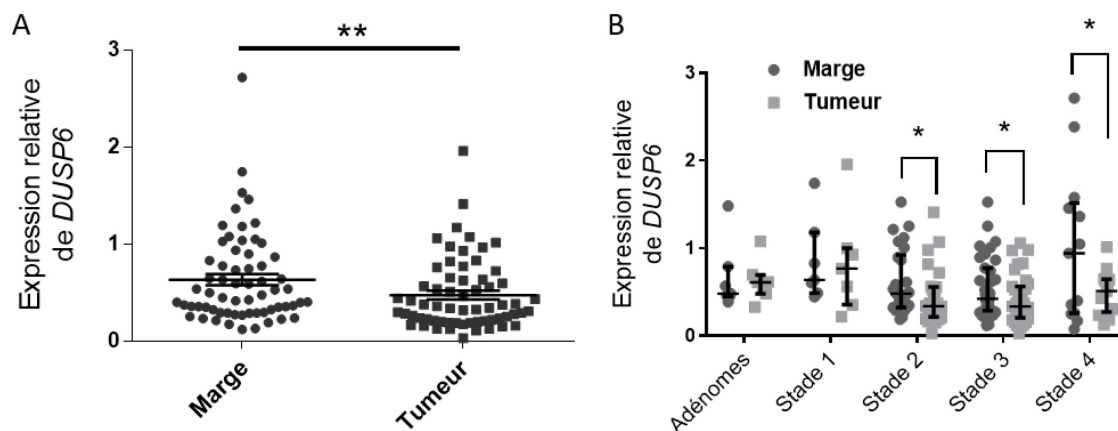


Figure 28 Diminution de l'expression en ARNm de *DUSP6* dans des tumeurs colorectales humaines

A) Expression des transcrits de *DUSP6* a été analysé en qPCR dans des tumeurs colorectales et la marge saine des mêmes patient-es tous stades confondus (** $p < 0.001$) (n=63). **B)** Expression de *DUSP6* a été analysée en qPCR dans des tumeurs colorectales paires et à différents stades (* $p < 0.05$) (n=88). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

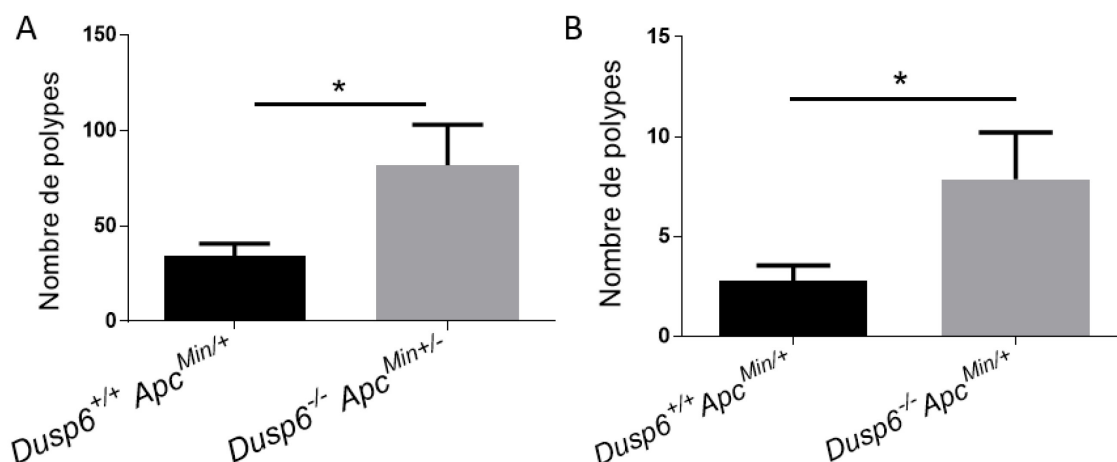


Figure 29 Les souris *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{-/-} développent plus de polypes dans l'intestin grêle et dans le côlon

A) Décompte du nombre de polypes dans l'intestin grêle de souris *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{+/+} et *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{-/-} âgées de 13 sem (*p<0.05; n≥7). **B)** Décompte du nombre de polypes dans le côlon de souris *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{+/+} et *Apc*^{Min/+};*Dusp6*^{-/-} âgées de 13 sem (*p<0.05; n≥7). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

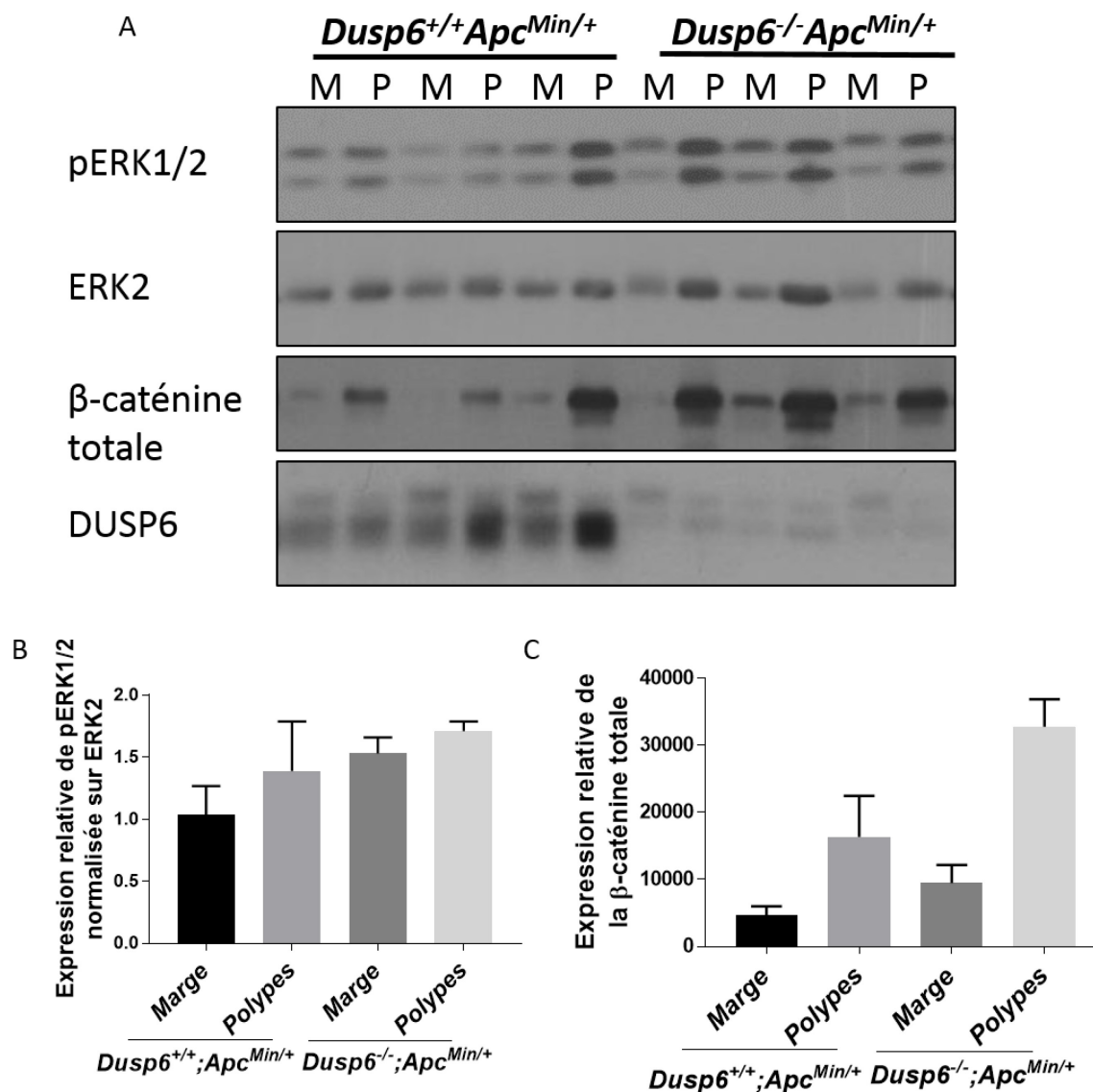


Figure 30 Augmentation de la phosphorylation de ERK2 et de la β-caténine dans les polypes de souris *Apc^{Min/+}*

A) Immunobuvardage contre DUSP6 et phosphoERK1/2 (pERK1/2) et la β-caténine totale sur des extraits totaux de polypes de côlon de souris *Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}* et *Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}* âgées de 13 sem. L'immunobuvardage contre la protéine ERK2 a été réalisé pour contrôler la quantité de protéines. (n=3) M : marge P : polypes **B)** Densitométrie de l'immunobuvardage de la marge et des polypes de côlon de souris *Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}* comparés aux polypes de côlon de souris *Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}* indiquant l'expression relative de pERK1/2 normalisée sur la protéine ERK2 (n=3) **C)** Densitométrie de l'immunobuvardage de la marge et des polypes de côlon de souris *Apc^{Min/+};Dusp6^{+/+}* comparés aux polypes de côlon de souris *Apc^{Min/+};Dusp6^{-/-}* indiquant l'expression relative de la β-caténine totale. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

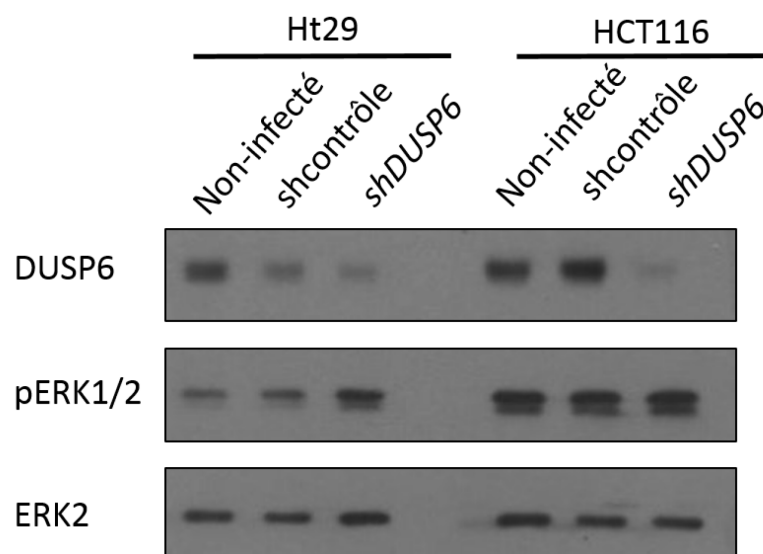


Figure 31 Modulation de la phosphorylation des ERK1/2 dans les cellules cancéreuses colorectales sous-exprimant DUSP6

Immunobuvardage contre DUSP6 et phosphorylation des ERK1/2 (pERK1/2) dans des lysats de cellules HT29 et HCT116 exprimant de manière stable un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre la protéine ERK2 a été effectué en guise de contrôle de charge.

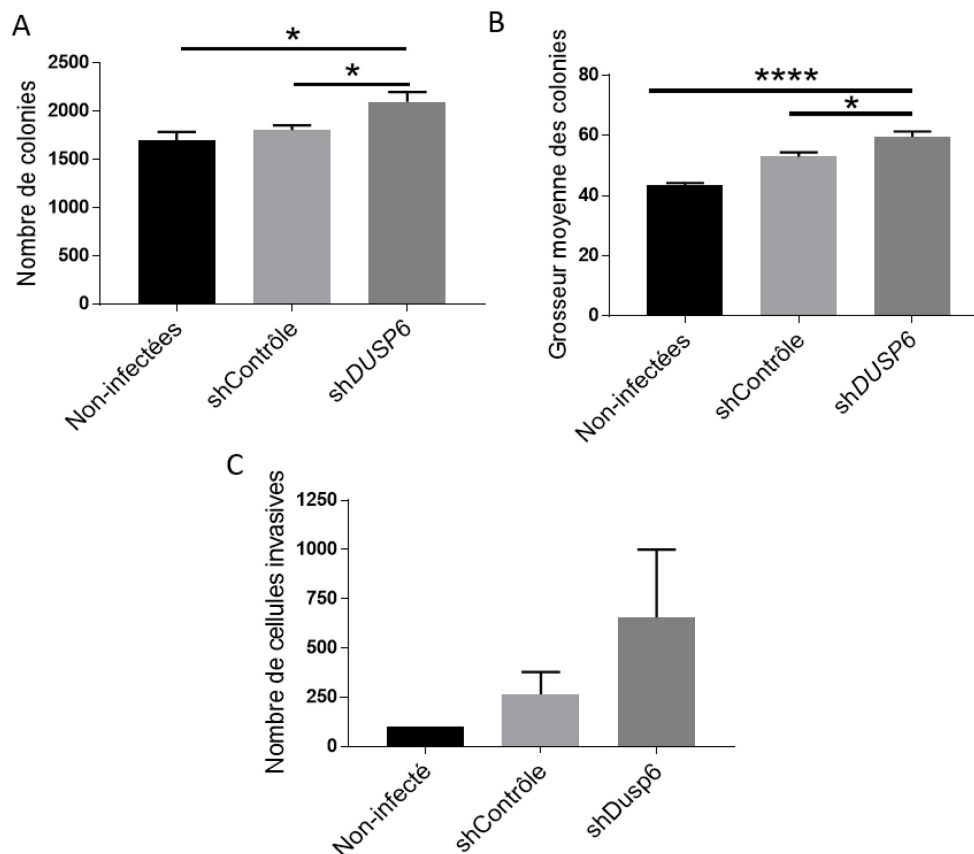


Figure 32 Les cellules HT29 sous-exprimant DUSP6 possèdent une meilleure capacité de croître en indépendance d’ancrage et d’envahir le Matrigel

A) Les cellules HT29 exprimant un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN shcontrôle ou non infectées ont étéensemencées dans du milieu contenant de l’agarose 0.7%. Le nombre de colonies formées a été compté après 2 sem suite à une coloration des colonies au MTT (* $p < 0.05$; $n = 3$). **B)** La grosseur des colonies formées a été calculée avec le logiciel ImageJ suite à une coloration des colonies au MTT (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$; $n = 3$) **C)** Les cellules HT29 exprimant un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN contrôle ou non infectées ont étéensemencées dans une chambre de Boyden contenant du Matrigel. Après 72h, les cellules ayant envahi le Matrigel et traversé la membrane semi-poreuse ont été comptées au binoculaire grâce à une coloration au crystal violet pour les visualiser ($n = 3$). Les barres d’erreur représentent l’erreur type moyenne.

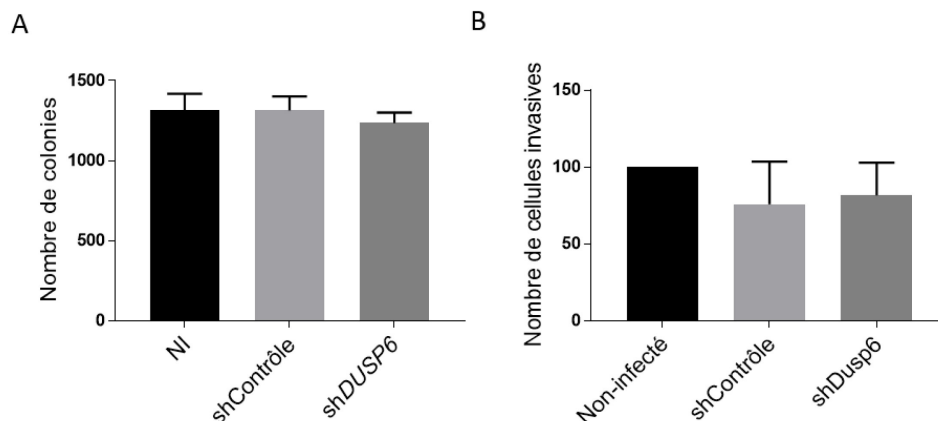


Figure 33 La capacité de croître en indépendance d'ancrage et d'envahir le Matrigel des cellules HCT116 n'est pas affectée par la baisse d'expression de DUSP6.

A) Les cellules HCT116 exprimant un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN shcontrôle ou non infectées ont étéensemencées dans du milieu contenant de l'agarose 0.7%. Le nombre de colonies formées a été compté après 2 sem suite à une coloration des colonies au MTT (* $p < 0.05$; $n=3$). **B)** Les cellules HCT116 exprimant un shARN dirigé contre DUSP6 ou un shARN contrôle ou non infectées ont étéensemencées dans une chambre de Boyden contenant du Matrigel. Après 48h, les cellules ayant envahi le Matrigel et traversé la membrane semi-poreuse ont été comptées au binoculaire grâce à une coloration au crystal violet pour les visualiser ($n=3$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

4. Discussion

La voie de signalisation RAS/MAPK contrôle plusieurs processus cellulaires associés au cancer. Elle est d'ailleurs principalement reconnue pour son importance dans la progression du cycle cellulaire, plus particulièrement dans la progression de la phase G1 et dans la transition G1/S du cycle (Aliaga et al., 1999; Jones & Kazlauskas, 2001; Rivard et al., 1999; Yamamoto et al., 2006). Il n'est donc pas surprenant que l'implication de la phosphatase DUSP6, un régulateur négatif et spécifique des ERK1/2, ait été déjà étudiée dans différents types de cancers. À titre d'exemple, dans le cancer pancréatique, l'expression de DUSP6 est diminuée fortement dans les stades tumoraux avancés (Furukawa et al., 2003). De plus, dans des lignées cellulaires de cancer du nasopharynx, la surexpression de DUSP6 inhibe la croissance en indépendance d'ancrage, la croissance de xénogreffes chez des souris immunodéficientes et atténue le phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse (Wong et al., 2012).

De nombreuses études se sont donc intéressées au rôle de la voie de signalisation RAS/MAPK dans le contexte du cancer colorectal. En effet, des mutations de type gain de fonction au niveau des gènes encodant pour KRAS ou BRAF, les principaux activateurs de la voie, ont été répertoriées dans plus de la moitié des cancers colorectaux (Pretlow & Pretlow, 2005; Worthley et al., 2010) (Davies et al., 2002; Rajagopalan et al., 2002). L'étude du rôle de la phosphatase DUSP6 dans le contrôle de l'homéostasie du côlon de même que dans le cancer colorectal s'avérerait donc très pertinente.

Pour cela, nous avons, dans un premier temps, utilisé un modèle murin invalidé pour *Dusp6* et analysé le phénotype intestinal de ces souris. Nous avons également vérifié l'importance de l'expression de DUSP6 dans un modèle tumorigenèse intestinale induite par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *Apc*. Et finalement, nous avons vérifié le rôle de DUSP6 dans le contrôle des propriétés tumorales de cellules cancéreuses colorectales humaines déjà établies en culture.

4.1 Contrôle de la prolifération épithéliale dans le côlon par *Dusp6*

La voie ERK/MAPK est très importante, voire nécessaire, pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales en culture (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999; Paquin et al., 2013; Voisin et al., 2008). Il a été démontré par notre groupe que l'activation de la signalisation ERK/MAPK était nécessaire notamment à l'expression de la cycline D1, à la dégradation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} (Rivard et al., 1999; Boucher et al., 2004) et à la translocation nucléaire d'E2F4 (Paquin et al., 2013), un facteur de transcription nécessaire à l'induction de gènes requis pour la phase S (Garneau et al., 2009). Cette voie de signalisation est également importante pour le maintien des

cellules souches intestinales *Lgr5*⁺ dans le cycle cellulaire. En effet, lorsque la voie ERK/MAPK est inhibée, les cellules souches *Lgr5*⁺ entrent en quiescence dans un modèle d'organoïdes en culture (Basak et al., 2017). Étant donné le rôle de DUSP6 dans le contrôle de la phosphorylation des ERK1/2 (Kidger et Keyse, 2016), nous nous sommes intéressés d'abord à son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans l'épithélium intestinal.

Tel qu'attendu, nous avons observé une augmentation de la prolifération cellulaire dans le côlon des souris invalidées pour *Dusp6* résultant en un allongement des cryptes. Cette augmentation de l'activité proliférative dans le côlon est associée à l'augmentation du niveau des formes phosphorylées et activées des kinases ERK1/2, principales cibles de DUSP6. Ces résultats suggèrent donc que le contrôle négatif que la phosphatase DUSP6 exerce sur les kinases ERK1/2 permet de ralentir la prolifération dans les cryptes coliques. De manière surprenante, nous n'avons pas observé de modulation de la prolifération cryptale dans l'intestin grêle des souris *Dusp6*^{-/-}. Ce résultat suggère que la prolifération cryptale dans le côlon est plus sensible à une modulation du niveau d'activation de ERK1/2. Il est aussi possible que dans l'intestin grêle, l'activation de ERK1/2 observée dans l'épithélium de la souris déficiente pour *Dusp6* (résultats non montrés et aussi voir Fig. 7) ne soit pas suffisante pour altérer la prolifération cryptale.

L'augmentation de prolifération dans le côlon peut résulter soit d'une augmentation du nombre de cellules souches et/ou d'une augmentation de l'activité proliférative des cellules-filles progénitrices. Nous avons donc analysé, dans des enrichissements d'épithélium de côlon, l'expression de deux marqueurs de cellules souches soit *Ascl2* et *Lgr5*. Aucune modulation significative de l'expression de ces marqueurs a été observée dans le côlon des souris déficientes pour *Dusp6*, ce qui suggère que le nombre de cellules souches n'est pas altéré dans ces souris. Ainsi, l'augmentation de la prolifération observée dans le côlon serait plutôt attribuable à une augmentation de l'activité proliférative des cellules progénitrices.

Afin d'examiner l'impact de la perte d'expression de *Dusp6* sur la capacité de renouvellement cellulaire du côlon, nous avons réalisé des cultures organotypiques de côlon à partir des souris *Dusp6*^{+/+} et *Dusp6*^{-/-}. Ce modèle consiste à isoler les cryptes coliques et à les cultiver *ex vivo* dans un milieu de culture comprenant du Matrigel et supplémenté avec différents facteurs reconstituant le microenvironnement nécessaire au maintien de la niche des cellules souches intestinales (Sato Stange et al., 2011). Nous avons donc utilisé ce modèle pour mesurer la capacité de régénération épithéliale des côlons de souris *Dusp6*^{+/+} et *Dusp6*^{-/-}. De manière intéressante, nous avons observé que les organoïdes déficients pour *Dusp6* se développent plus rapidement que les organoïdes contrôles invalidés pour *Dusp6*. En effet, les organoïdes expérimentaux démontrent une plus grande taille après

9 jours de culture. Des analyses d'incorporation d'EdU démontrent que cette croissance accrue des organoïdes *Dusp6*^{-/-} est attribuable à une augmentation du nombre de cellules prolifératives. Ainsi, ces résultats suggèrent que les cryptes coloniques des souris déficientes pour *Dusp6* possèdent une meilleure capacité de régénération.

4.2 Contrôle de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par la phosphatase DUSP6

Des altérations de la prolifération cellulaire dans l'épithélium intestinal sont souvent accompagnées de changements dans la différenciation cellulaire. Dans le côlon, trois principaux types cellulaires différenciés sont retrouvés : les cellules absorbantes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. Dans l'intestin grêle, on retrouve en plus les cellules de Paneth (Noah et al., 2011).

Tout d'abord, la différenciation des cellules absorbantes ne semble pas affectée tant dans le côlon que dans l'intestin grêle des souris invalidées pour *Dusp6*. En effet, l'expression du transporteur d'ions chlore *Slc26a3*, un marqueur des cellules absorbantes du côlon, et l'expression de la sucrase-isomaltase, un marqueur des cellules absorbantes du grêle, ne sont pas affectées chez les souris *Dusp6*^{-/-} comparativement aux souris contrôles. Des travaux précédents de notre laboratoire (Lemieux et al, 2011), avaient démontré que l'hyperactivation des ERK1/2 par une forme constitutivement active de MEK1 inhibait l'expression de marqueurs de différenciation des cellules Caco-2/15 tels que la sucrase-isomaltase et la villine suggérant une régulation négative de la différenciation entérocytaire par la signalisation MEK/ERK. Or, nos résultats chez les souris *Dusp6*^{-/-} suggèrent plutôt que la différenciation des cellules absorbantes n'est pas altérée. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette dichotomie dans les résultats. Premièrement, des mécanismes de compensation se sont peut-être déclenchés chez la souris invalidée pour *Dusp6*, mécanismes qui ont permis de maintenir et soutenir la production des cellules absorbantes. En effet, une augmentation des niveaux de d'autres DUSPs pourrait participer à maintenir la quantité de cellules absorbantes au même niveau. Deuxièmement, le niveau d'activation des ERK1/2 induit par l'expression d'un MEK1 constitutivement actif est probablement beaucoup plus élevé que celui induit par la délétion de *Dusp6*. L'activation des ERK1/2 observable chez nos souris *Dusp6*^{-/-} n'est probablement pas suffisante pour altérer la différenciation des cellules absorbantes du moins *in vivo*. D'autres analyses non seulement de l'expression d'autres marqueurs de différenciation des cellules absorbantes mais également de leur morphologie devraient être néanmoins effectuées pour démontrer hors de tout doute l'absence d'altération dans ce type cellulaire chez les souris *Dusp6*^{-/-}.

Au niveau des cellules entéroendocrines, nos marquages de la chromogranine A indiquent que la délétion de *Dusp6* n'affecte pas la production de ce type cellulaire différencié. Une étude récente a démontré dans des organoïdes de grêle qu'il faut inhiber les voies Wnt, Notch et ERK de façon combinée pour induire la différenciation des cellules entéroendocrines (Basak et al., 2017). Ceci suggère donc que d'autres voies de signalisation sont impliquées dans la différenciation des cellules entéroendocrines. Il n'est donc pas surprenant que l'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 induite par la délétion de *Dusp6* ne soit pas suffisante pour modifier le nombre de cellules entéroendocrines.

Tel qu'attendu, la délétion de la phosphatase *Dusp6* mène à une augmentation du nombre de cellules caliciformes dans le côlon. En effet, il a déjà été démontré que l'expression des formes mutantes oncogéniques de KRAS et de MEK1 favorisait la différenciation des cellules caliciformes (Feng et al., 2011; Heuberger et al., 2014; Yamashita et al., 2014). L'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 induite par la délétion de *Dusp6* serait donc suffisante pour induire une augmentation du nombre de cellules caliciformes dans le côlon. Au niveau de l'intestin grêle, on observe une légère augmentation du nombre de cellules caliciformes mais celle-ci n'est pas significative. Cependant, nous avons plutôt observé l'expansion des cellules de Paneth dans l'intestin grêle. De prime abord, ce résultat peut sembler surprenant vu les résultats rapportés par Feng et al. (2011) ainsi que par Heuberger et al. (2014). En effet, ces deux groupes ont montré qu'en suractivant la voie ERK/MAPK, soit par un KRAS oncogénique ou par un MEK constitutif actif, on observait une augmentation du nombre de cellules caliciformes mais une baisse du nombre de cellules de Paneth (Feng et al., 2011; Heuberger et al., 2014). Rappelons que ces études impliquaient une suractivation des ERK1/2 (par des formes oncogéniques de KRAS ou de MEK1) spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Peut-être, encore une fois, que l'activation des ERK1/2 observée chez nos souris *Dusp6*^{-/-} ne soit pas suffisante pour favoriser fortement la différenciation des cellules caliciformes au détriment des cellules de Paneth. Une autre hypothèse est que dans notre modèle murin *Dusp6*^{-/-}, un modèle de délétion totale, il y ait une contribution du stroma dans l'induction du nombre de cellules de Paneth. En effet, il a été démontré qu'en absence de Wnt3 chez la souris adulte, la différenciation des cellules de Paneth, n'est pas affectée indiquant que d'autres facteurs Wnts peuvent compenser (Farin et al., 2012). Cependant, les organoïdes en culture déficients dans la production de Wnt3 ne forment pas de ramifications et suite à quelques passages, ne survivent pas. L'ajout du facteur Wnt2b, un facteur sécrété par les myofibroblastes (Aoki et al., 2016; Valenta et al., 2016), au milieu de culture restaure en partie les ramifications et augmente la survie des organoïdes (Farin et al., 2012). De plus, lorsque ces organoïdes sont cultivés en co-culture avec des cellules mésenchymateuses, il y a une restauration du phénotype (Farin et al., 2012). Il serait donc intéressant de vérifier si, chez les souris *Dusp6*^{-/-},

l'augmentation du nombre de cellules de Paneth est associée à une augmentation de l'expression et de la sécrétion de Wnt2b par le mésenchyme.

Étant donné l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la différenciation des cellules de Paneth (Bastide et al., 2007; Mori-Akiyama et al., 2007), nous avons analysé différents paramètres dans l'iléon de la souris *Dusp6*^{-/-} reflétant le niveau d'activation de cette voie. Tout d'abord, nous avons observé une augmentation de l'expression protéique de la β -caténine chez les souris invalidées pour *Dusp6* comparées aux souris contrôles. Cela suggère l'activation de la voie Wnt/ β -caténine qui favorise la stabilisation de la β -caténine en empêchant sa dégradation (Clevers et Nusse, 2012). Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de l'expression de la β -caténine chez la souris *Dusp6*^{-/-} restent cependant à élucider. Une hypothèse est que l'absence de *Dusp6* dans les cellules épithéliales intestinales entraînent l'élévation des ERK1/2 qui phosphorylent alors et activent Lrp6, un corécepteur des facteurs Wnt (Lemieux et al., 2015). En effet, notre groupe a déjà rapporté la phosphorylation MEK-dépendante de Lrp6 dans des cellules épithéliales intestinales exprimant les formes oncogéniques de KRAS ou de BRAF. De manière intéressante, cette phosphorylation était aussi associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine telle que mesurée par essai TOPFLASH (Lemieux et al., 2015). Cependant, quand on analyse l'expression de gènes cibles de cette voie dans l'iléon de la souris *Dusp6*^{-/-}, nous observons l'augmentation de l'expression de *Défensina* et du *Lysozyme* mais pas de l'*Axine2* ou d'*Ascl2* (résultat non montré). Ces résultats surprenants nous ont rappelé ceux d'une autre étude qui a caractérisé le phénotype intestinal de souris exprimant une forme tronquée de la β -caténine (Δ N131 β -caténine) dans l'épithélium intestinal (Harada et al., 1999; Leedham et al., 2013). Cette forme tronquée ne possède pas les 76 acides aminés encodés par l'exon 3. Les auteurs ont rapporté que l'expression de cette forme tronquée mène à une augmentation du nombre de cellules de Paneth. Par contre, ils n'ont pas observé d'augmentation dans l'expression de gènes cibles classiques de la voie Wnt/ β -caténine tels que *C-myc*, *CyclinD1* et *CD44* et n'ont pas observé d'augmentation du nombre de cellules prolifératives. Ils ont spéculé que la sélectivité transcriptionnelle de la β -caténine dépendait du niveau protéique de la β -caténine pour l'induction de la transcription (Albuquerque et al., 2010; Darken et Wilson, 2001). En accord avec cela, un autre groupe a généré un modèle murin exprimant un allèle hypomorphe pour la β -caténine et ont démontré que l'expression des gènes spécifiques des cellules de Paneth était beaucoup plus sensible au niveau d'expression de la β -caténine que les gènes cibles associés aux cellules souches et prolifératives (Andreu et al., 2008). Ainsi, l'augmentation de l'expression protéique de la β -caténine induite par la délétion de *Dusp6* permettrait l'induction de gènes responsables de la différenciation

des cellules de Paneth, mais ne serait pas suffisante pour induire l'expression de l'*Axine2* et la prolifération cellulaire, du moins dans l'intestin grêle.

Une autre hypothèse pour expliquer l'augmentation du niveau protéique de la β -caténine et de certains gènes cibles dans l'épithélium intestinal des souris *Dusp6*^{-/-} est que des facteurs Wnt du mésenchyme soient sécrétés, par exemple Wnt2b (Aoki et al., 2016; Valenta et al., 2016). Nous soupçonnons que le mésenchyme des souris *Dusp6*^{-/-} puisse jouer un rôle dans la maturation des cellules de Paneth observée puisque, comme mentionné plus haut, une augmentation de l'activité de la voie ERK/MAPK dans les cellules épithéliales intestinales mène plutôt à une diminution du nombre de cellules de Paneth (Feng et al., 2011; Heuberger et al., 2014). Il serait donc intéressant de vérifier la contribution du mésenchyme et de Wnt2b dans l'expansion des cellules de Paneth chez les souris *Dusp6*^{-/-}.

En effectuant un double-marquage pour le lysozyme et l'alcian bleu, nous avons observé la présence de cellules doublement marquées dans l'iléon de la souris *Dusp6*^{-/-}. Ces cellules au phénotype intermédiaire ont déjà été décrites dans la littérature comme étant des cellules possédant à la fois des caractéristiques de cellules de Paneth et de cellules caliciformes (Kamal et al., 2001; Shorning et al., 2009; Troughton et Trier, 1969). Plus récemment, certains groupes se sont intéressés aux événements menant à l'expansion de ces cellules, considérées comme les précurseurs communs des cellules de Paneth et des cellules caliciformes. Leurs travaux ont notamment démontré que la voie ERK/MAPK pourrait être en partie responsable de la décision des précurseurs communs de se différencier en cellule caliciforme, plutôt qu'en cellule de Paneth (Coulombe et al., 2016; Heuberger et al., 2014). En effet, ils ont montré que la délétion de la phosphatase *Shp-2* au niveau de l'épithélium intestinal induisait une baisse du nombre de cellules caliciformes et de l'activité des ERK1/2 au profit d'une augmentation du nombre des cellules intermédiaires et de Paneth et d'une hausse de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. L'expression d'un MEK constitutif actif chez ces souris rétablit le ratio de cellules caliciformes et de cellules de Paneth, de même que le niveau d'activation des voies Wnt et ERK1/2 (Heuberger et al., 2014). Ainsi, ils ont conclu que le niveau d'activation de la voie MAPK était déterminant pour la décision de se différencier en cellules de Paneth ou cellules caliciformes. Mes résultats obtenus chez les souris invalidées pour *Dusp6* montrent que les voies ERK/MAPK et Wnt/ β -caténine sont toutes deux induites dans l'épithélium intestinal. Comme ces deux voies de signalisation semblent être les voies décisives pour la décision cellulaire de se différencier en cellules de Paneth versus en cellules caliciformes, il est probable que l'induction concomitante de ces deux voies de signalisation favorise l'expansion des cellules intermédiaires résultant ultimement en une augmentation à la fois du nombre de cellules de Paneth et caliciformes.

4.3 Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans l'inflammation intestinale

Nos résultats montrent que la perte d'expression de *Dusp6* dans le côlon est associée à une augmentation de la prolifération cryptale, à une croissance accélérée des organoïdes, à une augmentation du nombre de cellules caliciformes et à une couche de mucus interne plus épaisse. Ces résultats nous ont amenés à poser la question : est-ce que les souris invalidées pour *Dusp6* seraient en partie protégées contre un stress inflammatoire? En effet, la régénération cellulaire est un processus très important pour la réparation d'un épithélium endommagé (Sturm et Dignass, 2008). De plus, les souris invalidées pour *Muc2*, la principale mucine présente dans le côlon des souris, développent spontanément une colite, démontrant ainsi l'importance cruciale du mucus dans la protection du côlon contre l'inflammation (Van der Sluis et al., 2006).

Nous avons d'abord analysé l'expression de *DUSP6* dans des muqueuses intestinales de personnes atteintes de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse. De façon intéressante, l'expression en transcrits de *DUSP6* semble augmentée chez les patients atteints de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse. Cependant, cette augmentation est statistiquement non significative et il faudrait augmenter le nombre de patients analysés. Une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 a été aussi observée, dans d'autres études, chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (Dahan et al., 2008; Waetzig et al., 2002). L'augmentation d'expression de *DUSP6* que nous avons observée pourrait donc être due à l'activation des ERK1/2 chez ces patients. En effet, il est bien connu que l'activation des ERK1/2 peut mener à l'induction transcriptionnelle de *DUSP6* (Ekerot et al., 2008; Zhang et al., 2010).

Pour vérifier le rôle de *Dusp6* dans l'inflammation, nous avons utilisé le modèle d'induction d'une colite chimique par le DSS. De façon intéressante, les souris invalidées pour *Dusp6* développent une colite moins sévère que les souris contrôles, suggérant ainsi que *Dusp6* participerait au processus inflammatoire. Ces résultats rappellent une étude qui a démontré le potentiel protecteur contre l'inflammation de la voie de signalisation ERK/MAPK dans l'épithélium intestinal. En effet, cette étude démontre que les souris comportant une délétion conditionnelle de *Raf1* dans l'épithélium intestinal développent une colite plus sévère que les souris contrôles en réponse au DSS. (Edelblum et al., 2008). De plus, les analyses récentes du modèle de délétion conditionnelle de *Shp-2* ont démontré que ces souris développaient très rapidement une colite sévère, colite qui peut être prévenue par l'expression d'une forme active de KRAS (Yamashita et al., 2014), de BRAF (Gagné-Sansfaçon, en préparation) ou de MEK1 (Heuberger et al., 2014). Ainsi, ces équipes ont conclu que la baisse d'activation des ERK1/2 entraînée par l'inactivation de *Shp-2*, un activateur bien connu de la voie

ERK/MAPK (Heuberger et al., 2014; Yamashita et al., 2014, Gagné-Sansfaçon, en préparation), menait à une colite sévère. Un rôle protecteur des ERK1/2 dans l'épithélium colique a donc été proposé.

Les mécanismes par lesquels l'activation des ERK1/2 exerce un effet protecteur contre la colite impliquent probablement l'augmentation des capacités de régénération épithéliale et du nombre de cellules caliciformes dans le côlon. En effet, une meilleure régénération épithéliale permet une réparation rapide de l'épithélium suite aux dommages induits par l'inflammation (Sturm et Dignass, 2008). De plus, tel que mentionné ci-haut, le mucus protecteur sécrété par les cellules caliciformes est très important dans la protection contre l'inflammation (Van der Sluis et al., 2006). Ce mucus protecteur constitue une barrière entre la lumière intestinale et les bactéries commensales et pathogènes et est donc essentiel au maintien de l'homéostasie intestinale et à la protection contre l'inflammation (L. W. Peterson et Artis, 2014).

Les résultats obtenus chez la souris *Dusp6*^{-/-} semblent donc confirmer que les kinases ERK1/2 possèdent bel et bien un rôle protecteur contre l'inflammation colique, même si une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 est observée chez les patients souffrant d'une maladie inflammatoire intestinale. Ces résultats semblent contradictoires, mais il est possible que l'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 observable chez les personnes atteintes de maladies inflammatoires intestinales soit justement déclenchée pour combattre l'inflammation chronique dans l'intestin ou le côlon.

4.4 Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans le cancer colorectal

Étant donné l'implication des oncogènes *KRAS* et *BRAF* dans la carcinogenèse colorectale (Davies et al., 2002; Pretlow & Pretlow, 2005; Rajagopalan et al., 2002; Worthley et al., 2010), nous nous sommes aussi intéressés au rôle de la phosphatase des ERK1/2, DUSP6, dans le cancer colorectal.

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de *DUSP6* dans des échantillons de tumeurs colorectales. Globalement, une baisse d'expression a été observée dans les tumeurs comparées à la marge saine du même patient. Cette baisse d'expression est significative pour les stades 2, 3 et 4, les stades plus avancés de tumorigenèse. Un résultat similaire a d'ailleurs été observé dans le cancer pancréatique. En effet, il a été démontré que l'expression de DUSP6 est diminuée dans les stades avancés des tumeurs pancréatiques (Furukawa et al., 2003). Il a d'ailleurs été démontré que la diminution d'expression de DUSP6 dans les stades avancés de cancer pancréatique était notamment dû à la méthylation d'un îlot CpG présent dans l'intron 1 du gène *DUSP6* (Xu et al., 2005). Il serait

intéressant de valider les modifications épigénétiques du gène de *DUSP6* dans le cancer colorectal. Ces observations suggèrent donc un rôle potentiel de suppresseur de tumeur pour *Dusp6* dans le côlon et le pancréas et ce, tel que cela a déjà été suggéré dans d'autres types de cancers (Díaz-García et al., 2015; Furukawa et al., 2003; Wong et al., 2012). Néanmoins, pour confirmer le rôle de suppresseur de tumeurs de *Dusp6* dans le côlon, il faudrait laisser vieillir les souris *Dusp6*^{-/-} et analyser si avec l'âge, il y a apparition de tumeurs. Ces travaux sont en cours dans notre laboratoire.

Pour vérifier plus rapidement le rôle de *DUSP6* dans la tumorigenèse, nous avons utilisé le modèle d'initiation de la tumorigenèse, les souris *Apc*^{Min/+}. Un des deux allèles de ces souris possède une mutation encodant pour une forme tronquée d'*Apc* (Su et al., 1992) Cela permet donc la déstabilisation du complexe de dégradation de la β -caténine et ainsi la stabilisation de cette dernière et sa translocation au noyau (Clevers, 2006). Ces souris forment spontanément des polypes lorsqu'il y a perte d'hétérozygocité dans l'intestin grêle et dans le côlon. De manière intéressante, les souris doubles mutantes *Dusp6*^{-/-};*Apc*^{Min/+} ont développé significativement plus de polypes dans l'intestin grêle et dans le côlon que les souris contrôles *Dusp6*^{+/+}*Apc*^{Min/+}. Ce résultat est en accord avec une étude qui a préalablement montré que l'activation des ERK1/2 est nécessaire à la formation de polypes chez les souris *Apc*^{Min/+} (Lee et al., 2010). En effet, le traitement des souris *Apc*^{Min/+} avec un inhibiteur de MEK pour inhiber la phosphorylation des ERK1/2, développent peu ou pas de polypes démontrant ainsi la nécessité de ces kinases dans l'induction de la polypose (Lee et al., 2010). Ainsi, les résultats obtenus chez les souris *Dusp6*^{-/-}*Apc*^{Min/+} confirment que la voie ERK/MAPK est importante dans la tumorigenèse induite par l'inactivation d'*Apc*.

Finalement, afin de déterminer la fonction de *DUSP6* dans des cellules cancéreuses colorectales humaines, nous avons utilisé les lignées HT29 et HCT116 exprimant respectivement le gène *BRAF* muté ou le gène *KRAS* muté (Davies et al., 2002; Schroy et al., 1995). Dans les cellules HT29, l'inhibition d'expression de *DUSP6* par interférence à l'ARN augmente leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage et leur potentiel invasif. Ces résultats étaient attendus parce que l'activation de la voie ERK/MAPK par l'expression de formes mutantes de *KRAS* (Ikenoue et al., 2004) (Cagnol et Rivard, 2013; Nandan et al., 2008), de *BRAF* (Cagnol et Rivard, 2013; Ikenoue et al., 2004) ou de *MEK1* (Lemieux et al., 2009) est suffisante pour induire une transformation oncogénique de cellules épithéliales intestinales de rat immortalisées, les IEC-6 (Boucher et al., 2004; Lemieux et al., 2009). Cette transformation est associée à l'acquisition de propriétés tumorales, migratoires et métastatiques qui sont toutes MEK-dépendantes (Cagnol et Rivard, 2013; Lemieux et al., 2009). De plus, il est bien connu que l'inhibition pharmacologique de MEK dans les cellules cancéreuses colorectales humaines inhibe leur croissance, induisant souvent la mort cellulaire

(Balmanno et al., 2009; Lemieux et al., 2009; Solit et al., 2006; Wang et al., 2013). Pris ensemble, ces résultats ainsi que d'autres de la littérature (Corcoran et al., 2015; Yeh et al., 2009) suggèrent fortement que l'activation des kinases ERK1/2 favorise la carcinogenèse colorectale. Ces résultats rappellent les résultats obtenus dans les cellules de cancer pancréatique PCI-35 et PK8 qui, lorsqu'il y a surexpression de *DUSP6*, prolifèrent moins rapidement et sont moins résistantes à l'apoptose (Furukawa et al., 2003). Rappelons que des mutations au niveau de l'oncogène KRAS sont présentes dans plus de 90% des cancers pancréatiques suggérant que cette voie de signalisation est importante dans la carcinogenèse pancréatique, suggestion qui est appuyée par plusieurs études réalisées dans les cellules cancéreuses pancréatiques en culture (Friedlander et al., 2009; Ischenko et al., 2014; P. Wang et al., 2015) et dans des modèles murins exprimant la forme mutante de KRAS dans le pancréas (Aguirre et al., 2003; Hingorani et al., 2003).

De façon étonnante, les cellules HCT116 sous-exprimant DUSP6 n'ont pas démontré une meilleure capacité de croître en indépendance d'ancrage et une meilleure capacité d'invasion. Ceci peut être dû au fait que la baisse d'expression de DUSP6 dans les HCT116 n'induit pas une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 comme il est possible de voir dans les cellules HT29. Nos résultats suggèrent donc que dans les HCT116, DUSP6 n'est pas un régulateur important du niveau d'activation des kinases ERK1/2. En effet, les niveaux de phosphorylation des ERK1/2 sont élevés dans ces cellules ce qui pourrait empêcher une modulation des niveaux de phosphorylation puisque ceux-ci sont saturés. Les cellules HT29 expriment la forme mutante *BRAF*^{V600E}, les cellules HCT116 expriment plutôt une forme mutante de KRAS, soit *KRAS*^{G13D} (Schroy et al., 1995) pouvant possiblement expliquer la différence des niveaux d'activation des ERK1/2. Les lignées cellulaires cancéreuses colorectales possèdent plusieurs mutations, il est donc possible que ces modulations des niveaux de phosphorylation des ERK1/2 soient plutôt dues à un mélange de plusieurs mutations ou modulations d'expression protéique. Les résultats devront donc être confirmés dans d'autres lignées cancéreuses colorectales mutées ou non pour *BRAF* et *KRAS*.

Conclusion et perspectives

La voie ERK/MAPK a été grandement étudiée dans les cellules épithéliales intestinales pour son rôle dans le contrôle de l'homéostasie intestinale et dans le développement du cancer colorectal. Par contre, le rôle de la phosphatase cytoplasmique DUSP6 spécifique aux ERK1/2 n'a jamais été étudié dans l'épithélium intestinal. Les objectifs de ma maîtrise étaient de déterminer les rôles de DUSP6 dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans la carcinogenèse colorectale.

Nous avons démontré grâce à un modèle de souris invalidées pour *Dusp6* que la phosphorylation des ERK1/2 est augmentée dans l'épithélium de l'intestin grêle et du colon de ces souris. Ce modèle de souris nous a également permis de démontrer que cette phosphatase exerce un contrôle sur la prolifération cryptale dans le côlon. En effet, la délétion de *Dusp6* résulte en une augmentation du nombre de cellules prolifératives par crypte, mène à un allongement des cryptes et à une meilleure capacité de régénération épithéliale démontrée ici par un modèle d'organoïdes *ex vivo*. Ces souris présentaient également une altération de la différenciation des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. En effet, une augmentation du nombre de cellules caliciformes a été observée dans le côlon de ces souris. Ces résultats soulèvent différentes questions au niveau du mécanisme expliquant cette altération de la différenciation qui passe très fort probablement par les kinases ERK1/2, les seuls substrats spécifiques connus de DUSP6. Il serait donc intéressant d'investiguer plus directement le rôle de ces kinases par exemple, dans le contrôle transcriptionnel de la différenciation des cellules caliciformes.

De plus, une augmentation du nombre de cellules de Paneth a été observée chez les souris *Dusp6*^{-/-}. Comme il est bien connu que la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle dans la maturation de ces cellules (Mori-Akiyama et al., 2007) (Bastide et al., 2007), l'expression de la β -caténine a été analysée. De façon étonnante, une augmentation de la β -caténine a été observée chez les souris invalidées pour *Dusp6* pouvant ainsi expliquer l'augmentation du nombre de cellules de Paneth. Cette augmentation du nombre de cellules de Paneth est de prime abord étonnante puisque plusieurs modèles d'activation de la voie ERK/MAPK ont démontré plutôt une baisse du nombre de cellules de Paneth (Feng et al., 2011; Heuberger et al., 2014). Par contre, ces modèles impliquaient l'expression strictement épithéliale d'un KRAS oncogénique ou d'un MEK constitutif actif suggérant ainsi que l'activation des ERK1/2 dans le mésenchyme puisse peut-être être impliquée dans le contrôle des cellules de Paneth chez la souris *Dusp6*^{-/-}. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression des différents facteurs Wnts sécrétés par le mésenchyme qui pourrait possiblement être induite par l'activation des ERK1/2 dans le mésenchyme et expliquer l'augmentation des cellules de Paneth.

Les souris invalidées pour *Dusp6* sont également résistantes à une colite induite au DSS. En effet, comme ces souris possèdent un nombre plus élevé de cellules caliciformes et une meilleure capacité de régénération, ce résultat n'est pas si surprenant. D'ailleurs, l'expression en ARNm de *DUSP6* dans des échantillons de personnes atteintes de colite ulcéreuse ou de maladie de Crohn est légèrement augmentée soulevant ainsi la possibilité d'une implication de DUSP6 dans les maladies inflammatoires intestinales. Néanmoins, il serait pertinent d'analyser en parallèle l'expression de DUSP6 et la phosphorylation ERK en immunohistochimie dans la muqueuse de patients souffrant d'inflammation intestinale et ce, dans le but de voir dans quel(s) type(s) cellulaire(s) ces protéines sont modulées.

Étant donné l'implication connue des activateurs des ERK1/2 dans le développement du cancer colorectal (Fang et Richardson, 2005), nous avons analysé l'expression de *DUSP6* dans des tumeurs colorectales et avons observé une diminution des transcrits de plus en plus prononcée dans les stades avancés suggérant que la diminution de *DUSP6* pourrait constituer un avantage pour le développement d'un cancer colorectal. D'ailleurs, l'absence de *Dusp6* stimule la tumorigénèse induite par l'inactivation d'*Apc* chez la souris. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'absence de *Dusp6* affecte également la tumorigénèse induite par les formes oncogéniques de KRAS ou BRAF chez la souris. Le rôle de DUSP6 dans l'effet oncogénique de BRAF serait particulièrement pertinent à la vue de nos résultats qui montrent une augmentation des propriétés de croissance et invasives des cellules cancéreuses colorectales humaines mutées pour BRAF lorsqu'on inactive DUSP6. Comme la mutation BRAF est en grande partie responsable de la formation des cancers de type dentelé (ou serrated), l'analyse de l'expression de DUSP6 chez les patients souffrant de ce type de cancer devrait être aussi envisagée. En effet, il serait intéressant de valider si la diminution de l'expression de DUSP6 est associée à un moins bon pronostic chez ces patients.

En conclusion, ces travaux auront permis de mettre en évidence, pour la première fois, le rôle de la phosphatase DUSP6 dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans le développement de pathologies telles que l'inflammation intestinale et le cancer colorectal.

Remerciements

Tout d'abord, un gros merci à la P^{re} Nathalie Rivard pour m'avoir accueillie dans le laboratoire pour mes stages et ma maîtrise. Un merci spécial pour avoir cru en moi peu importe la situation, pour m'avoir poussé à dépasser mes limites et pour m'avoir aidée à aller le moins possible «straight to the point».

Merci également à tous les membres du laboratoire présents ou passés : Jessica Gagné-Sansfaçon, Ariane Langlois, Marie-Josée Langlois, Caroline Leblanc, Stephen McManus, Marilène Paquette, Jennifer Raisch, Vanessa Vaillancourt-Lavigueur. Merci pour votre contribution au projet, mais surtout pour toutes les heures de folies que nous avons passées ensemble.

Un merci tout spécial à Sébastien Cagnol pour avoir été mon mentor et Marie-Josée Langlois pour toute son aide apportée à mon projet de maîtrise.

J'aimerais également remercier le laboratoire du P^r Jeffery Molkentin pour nous avoir fourni les souris invalidées pour *Dusp6* et la P^{re} Julie Carrier pour nous avoir donné accès à sa banque de tissus de tumeurs colorectales. J'aimerais remercier les membres du jury de mon mémoire soit P^{re} Marie-Josée Boucher et P^r Pedro Geraldès de prendre le temps de lire et corriger mon mémoire. Finalement, j'aimerais remercier le P^r Mannix Auger-Messier pour avoir fait partie de mon comité d'encadrement.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, mes deux parents Joanne Dazé et Luc Beaudry et ma petite sœur Cloé Beaudry. Merci d'avoir cru en moi tout au long de mon parcours universitaire. J'aimerais également remercier mon copain William Leclerc Bellavance. Merci de m'avoir enduré toutes ces années à travers les bons coups et les mauvais coups.

Liste des références

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. et Kemler, R. (1997). Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The EMBO journal*, 16(13), 3797-3804.
- Abraham, C. et Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 361(21), 2066-2078.
- Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., Redston, M. S., et al. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, 17(24), 3112-3126.
- Albuquerque, C., Baltazar, C., Filipe, B., Penha, F., Pereira, T., Smits, R., Cravo, M., et al. (2010). Colorectal cancers show distinct mutation spectra in members of the canonical WNT signaling pathway according to their anatomical location and type of genetic instability. *Genes Chromosomes and Cancer*, 49(8), 746-759.
- Aliaga, J. C., Deschênes, C., Beaulieu, J. F., Calvo, E. L. et Rivard, N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *The American journal of physiology*, 277(3 Pt 1), G631-G641.
- Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J. et Rodrigues, C. M. (2010). The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*, 9(45), 145-152.
- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M. M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., et al. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Developmental biology*, 324(2), 288-96.
- Anjum, R. et Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(10), 747-58.
- Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C. L., Golson, M. L., Zahm, A. M., et al. (2016). Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(2), 175-188.
- Archer, S. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2155-8.
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q. et Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*, 5(1), 19-27.
- Arnold, C. N., Goel, A., Blum, H. E. et Boland, C. R. (2005). Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*, 104(10), 2035-47.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), 411-20.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. et Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915-20.
- Bagnyukova, T. V, Restifo, D., Beeharry, N., Gabitova, L., Li, T., Serebriiskii, I. G., Golemis, E. a, et al. (2013). DUSP6 regulates drug sensitivity by modulating DNA damage response. *British journal of cancer*, 109(4), 1063-71.

- Balmano, K., Chell, S. D., Gillings, A. S., Hayat, S. et Cook, S. J. (2009). Intrinsic resistance to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) is associated with weak ERK1/2 signalling and/or strong PI3K signalling in colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 125(10), 2332-2341.
- Barker, N., van de Wetering, M. et Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes & development*, 22(14), 1856-64.
- Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A. et Clevers, H. (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell*, 20(2), 1-14.
- Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., et al. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology*, 178(4), 635-648.
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., Van den Born, M. M. W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., et al. (2002). β -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell*, 111(2), 251-263.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. et Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592), 638-642.
- Beisner, J., Teltschik, Z., Ostaff, M. J., Tiemessen, M. M., Staal, F. J. T., Wang, G., Gerseman, M., et al. (2014). TCF-1-mediated Wnt signaling regulates Paneth cell innate immune defense effectors HD-5 and -6: implications for Crohn's disease. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(5), G487-G498.
- Bell, S. P. et Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 333-374.
- Bermudez, O., Marchetti, S., Pagès, G. et Gimond, C. (2008). Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene*, 27(26), 3685-3691.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., et al. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*.
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., et al. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491(7424), 399-405.
- Blache, P., Van De Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J. N., Clevers, H., et al. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *Journal of Cell Biology*, 166(1), 37-47.
- Boland, C. R., Sato, J., Appelman, H. D., Bresalier, R. S. et Feinberg, a P. (1995). Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nature medicine*, 1(9), 902-9.
- Boucher, M.-J., Jean, D., Vézina, A. et Rivard, N. (2004). Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 286(5), G736-46.
- Bray, S. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular*

cell biology, 7(September), 678-689.

- Cagnol, S. et Rivard, N. (2013). Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene*, 32(5), 564-76.
- Camps, M., Nichols, A. et Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(1), 6-16.
- Camps, M., Nichols, a, Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., et al. (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5367), 1262-1265.
- Carulli, A. J., Samuelson, L. C. et Schnell, S. (2014). Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 6(3), 243-57.
- Caruso, R., Fina, D., Peluso, I., Stolfi, C., Fantini, M. C., Gioia, V., Caprioli, F., et al. (2007). A Functional Role for Interleukin-21 in Promoting the Synthesis of the T-Cell Chemoattractant, MIP-3alpha, by Gut Epithelial Cells. *Gastroenterology*, 132(1), 166-175.
- Caunt, C. J. et Keyse, S. M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS Journal*.
- Cavallo, R. a, Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. a, Clevers, H., Peifer, M., et al. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395(6702), 604-608.
- Clevers, H. (2006). Wnt/B-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*.
- Clevers, H., Loh, K. M. et Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6205), 1248012.
- Clevers, H. et Nusse, R. (2012). Wnt/B-catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205.
- Contractor, N. V, Bassiri, H., Reya, T., Park, A. Y., Baumgart, D. C., Wasik, M. A., Emerson, S. G., et al. (1998). Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol*, 160(1), 385-394.
- Corcoran, R. B., Atreya, C. E., Falchook, G. S., Kwak, E. L., Ryan, D. P., Bendell, J. C., Hamid, O., et al. (2015). Combined BRAF and MEK inhibition with dabrafenib and trametinib in BRAF V600-Mutant colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 33, p. 4023-4031).
- Coulombe, G., Leblanc, C., Cagnol, S., Maloum, F., Lemieux, E., Perreault, N., Feng, G.-S., et al. (2013). Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Molecular and cellular biology*, 33(11), 2275-84.
- Crosnier, C., Stamatakis, D. et Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature reviews. Genetics*, 7(5), 349-59.
- Cui, Y., Parra, I., Zhang, M., Hilsenbeck, S. G., Tsimelzon, A., Furukawa, T., Horii, A., et al. (2006). Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: A mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer Research*, 66(11), 5950-5959.

- Dahan, S., Roda, G., Pinn, D., Roth-Walter, F., Kamalu, O., Martin, A. P. et Mayer, L. (2008). Epithelial: Lamina Propria Lymphocyte Interactions Promote Epithelial Cell Differentiation. *Gastroenterology*, 134(1).
- Daksis, J. I., Lu, R. Y., Facchini, L. M., Marhin, W. W. et Penn, L. J. Z. (1994). Myc Induces Cyclin D1 Expression in the Absence of De-Novo Protein-Synthesis and Links Mitogen-Stimulated Signal-Transduction to the Cell-Cycle. *Oncogene*, 9(12), 3635-3645.
- Darken, R. S. et Wilson, P. A. (2001). Axis Induction by Wnt Signaling: Target Promoter Responsiveness Regulates Competence. *Developmental Biology*, 234(1), 42-54.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
- Delaney, J., Chiarello, R., Villar, D., Kandalam, U., Castejon, A. M. et Clark, M. A. (2008). Regulation of c-fos, c-jun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: Role of ERK1/2 MAP kinases. *Neurochemical Research*, 33(3), 545-550.
- Denu, J. M. et Dixon, J. E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol*, 2(5), 633-641.
- Díaz-García, C. V., Agudo-López, A., Pérez, C., Prieto-García, E., Iglesias, L., Ponce, S., Rodríguez Garzotto, A., et al. (2015). Prognostic value of dual-specificity phosphatase 6 expression in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(2), 1199-206.
- Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L. et Podolsky, D. K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor B-independent pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 94(1), 376-383.
- Edelblum, K. L., Washington, M. K., Koyama, T., Robine, S., Baccarini, M. et Polk, D. B. (2008). Raf Protects Against Colitis by Promoting Mouse Colon Epithelial Cell Survival Through NF- κ B. *Gastroenterology*, 135(2).
- Eggstein, S., Franke, M., Kutschka, I., Manthey, G., Specht, B. U. Von, Ruf, G. et Farthmann, E. H. (1999). Expression and activity of mitogen activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut*, 44, 834-838.
- Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., et al. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *The Biochemical journal*, 412(2), 287-98.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., et al. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Research*, 60(16), 4366-4371.
- Everard, A., Lazarevic, V., Gaïa, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., Delzenne, N. M., et al. (2014). Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME Journal*, 8(10), 2116-2130.
- Fang, J. Y. et Richardson, B. C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncology*.
- Farin, H. F., Jordens, I., Mosa, M. H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D. V. F., de Punder, K., et al. (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche.

Nature, 530(7590), 340-3.

- Farin, H. F., Van Es, J. H. et Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of paneth cells. *Gastroenterology*, 143(6).
- Feagins, L. a, Souza, R. F. et Spechler, S. J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 6(maY), 297-305.
- Fearon, E. R. et Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*.
- Feng, B., Jiao, P., Helou, Y., Li, Y., He, Q., Walters, M. S., Salomon, A., et al. (2014). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 (MKP-3)-deficient mice are resistant to diet-induced obesity. *Diabetes*, 63(9), 2924-2934.
- Feng, Y., Bommer, G. T., Zhao, J., Green, M., Sands, E., Zhai, Y., Brown, K., et al. (2011). Mutant kras promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology*, 141(3).
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fischer, A. et Gessler, M. (2007). Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K. et Nuñez, G. (2009). Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol Rev*, 227(1), 106-128.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. et Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34), 13780-5.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. et Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964-8.
- Friedlander, S. Y. G., Chu, G. C., Snyder, E. L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., et al. (2009). Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*, 16(5), 379-389.
- Furukawa, T., Sunamura, M., Motoi, F., Matsuno, S. et Horii, A. (2003). Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *The American journal of pathology*, 162(6), 1807-15.
- Garneau, H., Paquin, M. C., Carrier, J. C. et Rivard, N. (2009). E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 221(2), 350-358.
- Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. et Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4510-5.
- Gerbe, F., Van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology*, 192(5), 767-780.

- Ghaleb, A. M., Aggarwal, G., Bialkowska, A. B., Nandan, M. O. et Yang, V. W. (2008). Notch inhibits expression of the Krüppel-like factor 4 tumor suppressor in the intestinal epithelium. *Molecular cancer research : MCR*, 6(12), 1920-7.
- Ghaleb, A. M., McConnell, B. B., Kaestner, K. H. et Yang, V. W. (2011). Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Developmental Biology*, 349(2), 310-320.
- Gierut, J. J., Lyons, J., Shah, M. S., Genetti, C., Breault, D. T. et Haigis, K. M. (2015). Oncogenic K-Ras promotes proliferation in quiescent intestinal stem cells. *Stem Cell Research*, 15(1), 165-171.
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W. F. et Veldhuyzen Van Zanten, S. J. O. (2006). Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4136-4141.
- Gregorieff, A., Stange, D. E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P. J., et al. (2009). The Ets-Domain Transcription Factor Spdef Promotes Maturation of Goblet and Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*, 137(4), 1333-1345-1333.
- Gregorieff, A. et Wrana, J. L. (2016). Seeing is believing: Wnt3 localization in the gut epithelium. *Cell Research*, 26(5), 515-516.
- Groden, J., Thliveris, a, Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), 589-600.
- Grund, E. M., Spyropoulos, D. D., Watson, D. K. et Muise-Helmericks, R. C. (2005). Interleukins 2 and 15 regulate Ets1 expression via ERK1/2 and MNK1 in human natural killer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4772-4778.
- Guha, M., Connell, M. A. O., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S., Stern, D., et al. (2001). Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1 / 2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98(5), 1429-1439.
- Haegebarth, A., Bie, W., Yang, R., Crawford, S. E., Vasioukhin, V., Fuchs, E. et Tyner, A. L. (2006). Protein tyrosine kinase 6 negatively regulates growth and promotes enterocyte differentiation in the small intestine. *Molecular and cellular biology*, 26(13), 4949-57.
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., et al. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, 40(5), 600-608.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T. O., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M. et Taketo, M. M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the β -catenin gene. *EMBO Journal*, 18(21), 5931-5942.
- He, X., Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., et al. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407(6803), 530-535.
- Hermiston, M. L. et Gordon, J. I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5239), 1203-7.
- Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K. S., Rajewsky, K. et Birchmeier, W. (2014).

- Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3472-3477.
- Hill, D. A. et Artis, D. (2010). Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual review of immunology*, 28, 623-667.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450.
- Hoffman, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acetyltransferases with implications for Wnt signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3), 111-112.
- Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P. et Graves, B. J. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry*, 80(1), 437-471.
- Hooper, L. V et Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology*, 10(3), 159-69.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599-603.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Aragaki, J., Tanaka, Y., Imamura, J., Imamura, T., et al. (2004). Different Effects of Point Mutations within the B-Raf Glycine-Rich Loop in Colorectal Tumors on Mitogen-Activated Protein / Extracellular Signal- Regulated Kinase Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase and Nuclear Factor B Pathway and Cellular T. *Cancer Research*, 64(30), 3428-3435.
- Ischenko, I., Petrenko, O. et Hayman, M. J. (2014). Analysis of the tumor-initiating and metastatic capacity of PDX1-positive cells from the adult pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3466-71.
- Jass, J. R. (2002). Pathogenesis of colorectal cancer. *Surgical Clinics of North America*.
- Jass, J. R., Young, J. et Leggett, B. A. (2002). Evolution of colorectal cancer: Change of pace and change of direction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*.
- Jho, E. -h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N. et Costantini, F. (2002). Wnt/B-Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1172-1183.
- Johansson, Malin E V, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, H. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 15064-15069.
- Jones, S. M. et Kazlauskas, A. (2001). Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nature Cell Biology*, 3(2), 165-172.
- Jubb, A. M., Chalasani, S., Frantz, G. D., Smits, R., Grabsch, H. I., Kavi, V., Maughan, N. J., et al. (2006). Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene*, 25(24), 3445-3457.
- Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, et al. (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development (Cambridge, England)*, 141(11), 2206-15.

- Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K. et Perrimon, N. (1996). The segment polarity gene *porcupine* encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes and Development*, 10(24), 3116-3128.
- Kamal, M., Wakelin, D., Ouellette, A. J., Smith, A., Podolsky, D. K. et Mahida, Y. R. (2001). Mucosal T cells regulate paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of T. spiralis-infected mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 126(1), 117-125.
- Karam, S. M. (1999). [Frontiers in Bioscience 4, d286-298, March 15, 1999] LINEAGE COMMITMENT AND MATURATION OF EPITHELIAL CELLS IN THE GUT Sherif M. Karam. *BioScience*, (1), 286-298.
- Kaser, A., Zeissig, S. et Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology*, 28, 573-621.
- Kaser, a et Blumberg, R. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal immunology*, 3(1), 11-6.
- Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. a, Yang, V. W. et Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development (Cambridge, England)*, 129(11), 2619-28.
- Kazanjian, A., Noah, T., Brown, D., Burkart, J. et Shroyer, N. F. (2010). Atonal homolog 1 is required for growth and differentiation effects of notch/gamma-secretase inhibitors on normal and cancerous intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 139(3), 918-28, 928-916.
- Keyse, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2), 186-192.
- Khan, K. J., Ullman, T. A., Ford, A. C., Abreu, M. T., Abadir, A., Abadir, A., Marshall, J. K., et al. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 106(4), 661-673.
- Khor, B., Gardet, A. et Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-17.
- Kidger, A. M. et Keyse, S. M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Kim, K.-A. (2005). Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium. *Science*, 309(5738), 1256-1259.
- Kim, T. H. et Shivdasani, R. A. (2011). Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of math1 repression. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11427-11433.
- Kim, Y. S. et Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, a C., et al. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4999), 1366-1370.
- Kinzler, K. W. et Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*.

- Komatsu, K., Buchanan, F. G., Katkuri, S., Morrow, J. D., Inoue, H., Otaka, M., Watanabe, S., et al. (2005). Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology*, 129(2), 577-590.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. et Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics*, 19, 379-383.
- Kwon, K. H., Ohigashi, H. et Murakami, A. (2007). Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sciences*, 81(5), 362-371.
- Lavoie, H. et Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), 281-298.
- Lee, S. H., Hu, L.-L., Gonzalez-Navajas, J., Seo, G. S., Shen, C., Brick, J., Herdman, S., et al. (2010). ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice. *Nature Medicine*, 16(6), 665-670.
- Leedham, S. J., Rodenas-Cuadrado, P., Howarth, K., Lewis, A., Mallappa, S., Segditsas, S., Davis, H., et al. (2013). A basal gradient of Wnt and stem-cell number influences regional tumour distribution in human and mouse intestinal tracts. *Gut*, 62(1), 83-93.
- Leggett, B. et Whitehall, V. (2010). Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 138(6), 2088-2100.
- Lemieux, E., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C. et Rivard, N. (2009). Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125(7), 1575-1586.
- Lemieux, E., Boucher, M.-J., Mongrain, S., Boudreau, F., Asselin, C. et Rivard, N. (2011). Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 301(4), G719-30.
- Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J. et Rivard, N. (2015). Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*, 34(38), 4914-4927.
- Leow, C. C., Romero, M. S., Ross, S., Polakis, P. et Gao, W. Q. (2004). Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Research*, 64(17), 6050-6057.
- Lewis, J. (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in cell & developmental biology*, 9(6), 583-589.
- Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., et al. (2012). Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell*, 149(6), 1245-1256.
- Li, X., Jiang, S. et Tapping, R. I. (2010). Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*.
- López-Díaz, L., Jain, R. N., Keeley, T. M., VanDussen, K. L., Brunkan, C. S., Gumucio, D. L. et Samuelson, L. C. (2007). Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential

- secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Developmental Biology*, 309(2), 298-305.
- Lynch, H. T. et de la Chapelle, A. (2003). Hereditary Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(10), 919-932.
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. et Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunology*, 6(4), 666-77.
- Madara, J. L. et Carlson, S. L. (1985). Cup cells: further structural characterization of the brush border and the suggestion that they may serve as an attachment site for an unidentified bacillus in guinea pig ileum. *Gastroenterology*, 89(6), 1374-1386.
- Maillet, M., Purcell, N. H., Sargent, M. A., York, A. J., Bueno, O. F. et Molkentin, J. D. (2008). DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 31246-31255.
- Manichanh, C. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205-211.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, a, Hanski, M. L., Gratchev, a, Ilyas, M., Bodmer, W. F., et al. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1603-8.
- Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.-C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J. et Pagès, G. (2005). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology*, 25(2), 854-64.
- Marieb, E. N. et Hoehn, K. (2015). Anatomie et physiologie humaine (ERPI.). Montréal.
- Mark, J. K., Aubin, R. A., Smith, S. et Hefford, M. A. (2008). Inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 activity by interdomain binding. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28574-28583.
- Marra, G. et Boland, C. R. (1995). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(15), 1114-25.
- Medema, J. P. et Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318-26.
- Miller, H., Zhang, J., KuoLee, R., Patel, G. B. et Chen, W. (2007). Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World Journal of Gastroenterology*, 13(10), 1477-1486.
- Molenaar, M., Van De Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., et al. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates ??-catenin-induced axis formation in xenopus embryos. *Cell*, 86(3), 391-399.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.e42.
- Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J. H., Hamilton, S. R., Adams, H. P., Zhang, J.,

- Clevers, H., et al. (2007). SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*, 133(2), 539-546.
- Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., et al. (1998). The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 9323-9329.
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J. et Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400-6.
- Murphy, L. O. et Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Mutoh, H., Satoh, K., Kita, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Yamamoto, H., Isoda, N., et al. (2005). Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *International Journal of Developmental Biology*, 49(7), 867-871.
- Nandan, M. O., McConnell, B. B., Ghaleb, A. M., Bialkowska, A. B., Sheng, H., Shao, J., Babbin, B. A., et al. (2008). Kruppel-Like Factor 5 Mediates Cellular Transformation During Oncogenic KRAS-Induced Intestinal Tumorigenesis. *Gastroenterology*, 134(1), 120-130.
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B. et Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes and Development*, 11(18), 2323-2334.
- Ng, A. Y.-N., Waring, P., Ristevski, S., Wang, C., Wilson, T., Pritchard, M., Hertzog, P., et al. (2002). Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 122, 1455-1466.
- Noah, T. K., Donahue, B. et Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental Cell Research*.
- Noah, T. K., Kazanjian, A., Whitsett, J. et Shroyer, N. F. (2010). SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Experimental Cell Research*, 316(3), 452-465.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 603-606.
- Owens, D. M. et Keyse, S. M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22), 3203-3213.
- Packer, L. M., East, P., Reis-Filho, J. S. et Marais, R. (2009). Identification of direct transcriptional targets of V600EBRAF/ MEK signalling in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 22(6), 785-798.
- Paquin, M.-C., Cagnol, S., Carrier, J. C., Leblanc, C. et Rivard, N. (2013). ERK-associated changes in E2F4 phosphorylation, localization and transcriptional activity during mitogenic stimulation in human intestinal epithelial crypt cells. *BMC cell biology*, 14, 33.
- Peignon, G., Durand, A., Cacheux, W., Ayrault, O., Terris, B., Laurent-Puig, P., Shroyer, N. F., et al. (2011). Complex interplay between beta-catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut*, 60(2), 166-176.

- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K. H., et al. (2011). Dll1- and Dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology*, 140(4), 1230-1240.
- Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R. et Gordon, J. I. (2008). Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host and Microbe*.
- Peterson, L. W. et Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), 141-53.
- Pino, M. S. et Chung, D. C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. et Skarnes, W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 407(6803), 535-538.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. et Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes and Development*, 17(14), 1709-1713.
- Piya, S., Kim, J. Y., Bae, J., Seol, D. W., Moon, A. R. et Kim, T. H. (2012). DUSP6 is a novel transcriptional target of p53 and regulates p53-mediated apoptosis by modulating expression levels of Bcl-2 family proteins. *FEBS Letters*, 586(23), 4233-4240.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417-429.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., et al. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359(6392), 235-237.
- Pretlow, T. P. et Pretlow, T. G. (2005). Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of colorectal cancer? *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.
- Rad, R., Cadianos, J., Rad, L., Varela, I., Strong, A., Kriegl, L., Constantino-Casas, F., et al. (2013). A Genetic Progression Model of BrafV600E-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention. *Cancer Cell*, 24(1), 15-29.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. et Velculescu, V. E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418(6901), 934.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. et Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
- Ray, L. B. et Sturgill, T. W. (1988). Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 3753-7.
- Regimbald-Dumas, Y. et He, X. (2011). Wnt signalling: What is WTX? *The EMBO Journal*, 30(8), 1433-1443.
- Reya, T. et Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-50.
- Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., et al. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both

- Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO reports*, 9(4), 377-83.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., et al. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*, 6(5), 507-14.
- Rindi, G., Leiter, A. B., Kopin, A. S., Bordi, C. et Solcia, E. (2004). The « normal » endocrine cell of the gut: Changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Rivard, N., Boucher, M.-J., Asselin, C. et L'Allemain, G. (1999). MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *The American journal of physiology*, 277(4 Pt 1), C652-C664.
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature reviews. Genetics*, 6(8), 597-610.
- Rocchi, A., Benchimol, E., Bernstein, C. N., Bitton, A., Feagan, B., Panaccione, R., Glasgow, K. W., et al. (2012). Inflammatory bowel disease: A Canadian burden of illness review. *Canadian Journal of Gastroenterology*.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., et al. (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, 395(October), 608-612.
- Roskoski, R. (2012a). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Roskoski, R. (2012b). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*.
- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., et al. (2012). Identification of a cKit + colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5 + stem cells in mice. *Gastroenterology*, 142(5).
- Ruan, J.-W., Statt, S., Huang, C.-T., Tsai, Y.-T., Kuo, C.-C., Chan, H.-L., Liao, Y.-C., et al. (2016). Dual-specificity phosphatase 6 deficiency regulates gut microbiome and transcriptome response against diet-induced obesity in mice. *Nature Microbiology*, 2, 1-12.
- Sancho, R., Cremona, C. A. et Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports*, 16(5), 571-81.
- Sartor, R. (2006). Mechanisms of Disease : pathogenesis of Crohn ' s disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3(7), 390-407.
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W. J., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762-1772.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415-418.
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., O'Mahony, C. et Marchesi, J. R. (2006). Culture-independent

- analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3980-3988.
- Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. et Leiter, A. B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*.
- Schroy, P. C., Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K. A., Murnane, M. J., Yang, S., O'brein, M. J., et al. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer*, 76(2).
- Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C. et Li, L. (2008). Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology*, 134(3), 849-864.
- Sellon, R. K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L. A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D. M., et al. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity*, 66(11), 5224-5231.
- Shorning, B. Y., Zabkiewicz, J., McCarthy, A., Pearson, H. B., Winton, D. J., Sansom, O. J., Ashworth, A., et al. (2009). Lkb1 deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small intestine. *PLoS ONE*, 4(1), e4264.
- Shroyer, N. F., Helmrath, M. A., Wang, V. Y. C., Antalfy, B., Henning, S. J. et Zoghbi, H. Y. (2007). Intestine-Specific Ablation of Mouse atonal homolog 1 (Math1) Reveals a Role in Cellular Homeostasis. *Gastroenterology*, 132(7), 2478-2488.
- Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J. T., Bellen, H. J. et Zoghbi, H. Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes and Development*, 19(20), 2412-2417.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Snippert, H. J., Schepers, A. G., Van Es, J. H., Simons, B. D. et Clevers, H. (2014). Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. *EMBO Reports*, 15(1), 62-69.
- Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, 439(7074), 358-362.
- Spano, J. P., Fagard, R., Soria, J.-C., Rixe, O., Khayat, D. et Milano, G. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(2), 189-194.
- Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, C. R., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., et al. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*.
- Sturm, A. et Dignass, A. U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(3), 348-353.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., et al. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 668-70.

- Sug, H. L., Jong, W. L., Young, H. S., Su, Y. K., Suk, W. N., Won, S. P., Sang, H. K., et al. (2004). Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS*, 112(4-5), 233-238.
- Taupin, D. R., Kinoshita, K. et Podolsky, D. K. (2000). Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 799-804.
- Taylor, B. C., Zaph, C., Troy, A. E., Du, Y., Guild, K. J., Comeau, M. R. et Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 655-67.
- Theodosiou, A. et Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biology*, 3(7), 1-10.
- Tilg, H. et Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*, 121(6), 2126-2132.
- Trobridge, P., Knoblauch, S., Washington, M. K., Munoz, N. M., Tsuchiya, K. D., Rojas, A., Song, X., et al. (2009). TGF-B Receptor Inactivation and Mutant Kras Induce Intestinal Neoplasms in Mice via a β -Catenin-Independent Pathway. *Gastroenterology*, 136(5), 1680-1688.e7.
- Troughton, W. D. et Trier, J. S. (1969). Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *Journal of Cell Biology*, 41(1), 251-268.
- Tsai, Y. H., Vandussen, K. L., Sawey, E. T., Wade, A. W., Kasper, C., Rakshit, S., Bhatt, R. G., et al. (2014). ADAM10 regulates notch function in intestinal stem cells of mice. *Gastroenterology*, 147(4), 822-834.e13.
- Tsuchiya, K., Nakamura, T., Okamoto, R., Kanai, T. et Watanabe, M. (2007). Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer. *Gastroenterology*, 132(1), 208-20.
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A. E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M. B., Hausmann, G., et al. (2016). Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell Reports*, 15(5), 911-918.
- van der Flier, L. G. et Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71(1), 241-260.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., et al. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117-129.
- van Es, J. H., de Geest, N., van de Born, M., Clevers, H. et Hassan, B. A. (2010). Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nature Communications*, 1(2), 1-5.
- van Es, J. H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M. E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., et al. (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nature cell biology*, 7(4), 381-386.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044), 959-63.

- VanDussen, K. L. et Samuelson, L. C. (2010). Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Developmental Biology*, 346(2), 215-223.
- Vartanian, S., Bentley, C., Brauer, M. J., Li, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kim, J. S., et al. (2013). Identification of mutant K-Ras-dependent phenotypes using a panel of isogenic cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2403-2413.
- Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M. K., Rodrigue-Gervais, I. G., et al. (2008). Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC cancer*, 8, 337.
- Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S. et Schreiber, S. (2002). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated and Linked to TNF- α Signaling in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol The Journal of Immunology*, 168, 5342-5351.
- Walters, W. A., Xu, Z. et Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*, 588(22), 4223-4233.
- Wang, P., Sun, Y. C., Lu, W. H., Huang, P. et Hu, Y. (2015). Selective killing of K-ras–transformed pancreatic cancer cells by targeting NAD(P)H oxidase. *Chinese Journal of Cancer*, 34(4).
- Wang, Y., Giel-Moloney, M., Rindi, G. et Leiter, A. B. (2007). Enteroendocrine precursors differentiate independently of Wnt and form serotonin expressing adenomas in response to active beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11328-33.
- Wang, Y., Velho, S., Vakiani, E., Peng, S., Bass, A. J., Chu, G. C., Gierut, J., et al. (2013). Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. *Cancer Discovery*, 3(3), 294-307.
- Wehkamp, J., Wang, G., Kubler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R. J., et al. (2007). The Paneth Cell alpha-Defensin Deficiency of Ileal Crohn's Disease Is Linked to Wnt/Tcf-4. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3109-3118.
- Wong, V. C. L., Chen, H., Ko, J. M. Y., Chan, K. W., Chan, Y. P., Law, S., Chua, D., et al. (2012). Tumor suppressor dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) impairs cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated phenotype. *International Journal of Cancer*, 130(1), 83-95.
- Worthley, D.-L., Worthley, D.-L., Leggett, B.-A. et Leggett, B.-A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 31(2), 31-38.
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J. et Leggett, B. A. (2007). Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World Journal of Gastroenterology*.
- Xavier, R. J. et Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V. et Wilkinson, D. G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature*, 399(6733), 267-271.

- Xu, S., Furukawa, T., Kanai, N., Sunamura, M. et Horii, A. (2005). Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of Human Genetics*, 50(4), 159-167.
- Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S. et Nishida, E. (2006). Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression. *Current Biology*, 16(12), 1171-1182.
- Yamashita, H., Kotani, T., Park, J.-H., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ku, Y., et al. (2014). Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PloS one*, 9(3), e92904.
- Yang, Q., Bermingham, N. a, Finegold, M. J. et Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2155-2158.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., et al. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*, 20(14), 1688-1702.
- Yeh, J. J., Routh, E. D., Rubinas, T., Peacock, J., Martin, T. D., Shen, X. J., Sandler, R. S., et al. (2009). KRAS / BRAF mutation status and ERK1 / 2 activation as biomarkers for MEK1 / 2 inhibitor therapy in colorectal cancer colorectal cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 8(4), 834-843.
- Zeuthen, L. H., Fink, L. N. et Frokiaer, H. (2008). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-?? *Immunology*, 123(2), 197-208.
- Zhang, W., Liu, H. T. et Tu LIU, H. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9-18.
- Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A. C., Leidner, R. S., LaFramboise, T., Levine, A. D. et Halmos, B. (2010). Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(4), 577-586.